

Der Einfluss von Raver1 auf „polypyrimidine tract-binding protein“
- vermittelte Spleißprozesse

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sascha Swiniarski
aus Blankenburg

1. Referentin: Privatdozentin Dr. Susanne Illenberger
2. Referent: Professor Dr. Hans-Henning Arnold
eingereicht am: 27.04.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.06.2009
Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Swiniarski, S., Hennberg, B., Hüttelmaier, S., Arnold, H. & Illenberger, S.: Polypyrimidine tract-binding protein mediated alternative splicing in Raver1-deficient mice. (Poster) First International EURASNET Meeting on Alternative Splicing, Krakau (2008).

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Konstitutives Spleißen von RNA	2
1.2 Alternative Spleißprozesse	4
1.3 Das „polypyrimidine tract-binding protein“	6
1.4 Raver1	12
1.5 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	20
2.1.3 Bakterienstämme	20
2.1.4 Zelllinien	21
2.1.5 Vektoren	21
2.1.6 Minigene	23
2.1.7 Oligodesoxynukleotide	23
2.1.8 Antikörper	23
2.2 Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1 Anzucht von Bakterien	25
2.3 Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien	25
2.3.2 Transformation	26
2.3.3 Selektion transformierter <i>E. coli</i> -Bakterien	26
2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA	27
2.3.4.1 Mini-Plasmidpräparation	27
2.3.4.2 Midi-Plasmidpräparation	28
2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA	28
2.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	28
2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.3.8 DNA-Fragmentisolierung	29
2.3.9 Ligation	30

2.3.10	Hybridisierung von Oligodesoxynukleotiden zur Herstellung von Sequenzmarkern („tags“)	30
2.3.11	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	31
2.3.12	Sequenzierung	32
2.3.13	Präparation verschiedener Gewebe aus Maus	32
2.3.14	RNA Isolation aus Gewebe (embryonal/adult)	33
2.3.15	RNA Isolation aus Zelllinien	33
2.3.16	Qualitätsbestimmung von RNA	34
2.3.17	Synthese der cDNA durch Reverse Transkriptase	34
2.3.18	Generierung von Primern	35
2.3.19	Quantitative „real time“- PCR	35
2.4	Biochemische Methoden	37
2.4.1	Gelelektrophorese	37
2.4.1.1	Herstellung der Gele	37
2.4.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.4.2	Western Blot	38
2.4.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern	39
2.4.4	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	40
2.4.4.1	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i>	40
2.4.4.2	Aufreinigung mittels His-„tag“ markierter Proteine über Ni-NTA Agarose beads	40
2.4.4.3	Aufreinigung mittels GST-„tag“ markierter Proteine über Glutathion Sepharose 4 Fast Flow beads	41
2.4.4.4	Funktionelle Reinigung von Proteinen mittels Oligo(dt)-Säulen	42
2.4.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	42
2.4.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	42
2.4.5.2	Densitometrischer Proteinabgleich	43
2.4.6	Umpuffern von Proteinen	43
2.4.6.1	Umpuffern von Proteinen mittels Gelfiltration: PD10-Säulen	43
2.4.6.2	Umpuffern von Proteinen mittels Dialyse	44
2.4.7	Ankonzentration von Proteinen	44
2.4.8	Ribohomopolymer-Bindungs Assay	45
2.4.9	„Dot-Overlay“ Assay	45
2.4.9.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	45
2.4.9.2	Radioaktiver „Dot-Overlay“ Assay	46
2.4.9.3	Autoradiographie	46
2.4.10	PTB1-GST Pulldown	47
2.4.11	Herstellung von Zellextrakten	47
2.4.12	Herstellung von Gewebeextrakten	48

2.4.13	Protein-RNA UV-„Cross-Link“	48
2.5	Zellbiologische Methoden	49
2.5.1	Medium, Kulturgefäße und Kulturbedingungen	49
2.5.2	Passagieren von Zellen	49
2.5.3	Transiente Transfektion von Zellen	50
2.5.3.1	Transfektion mit Metafectene TM Transfektionsreagenz	50
2.5.3.2	Transfektion von siRNA mit Lipofectamine TM 2000	50
2.5.3.3	Transfektion von siRNA mit TransIT [®] -LT1	51
2.5.4	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	51
2.5.5	Fluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine	51
2.5.5.1	Indirekter Nachweis	51
2.5.5.2	Direkter Nachweis	52
2.5.5.3	Immunfluoreszenz	52
2.5.5.4	Einbetten der Präparate	52
3	Ergebnisse	53
3.1	RNA Bindungsanalysen von Raver1 und Raver2 <i>in vitro</i>	53
3.2	Charakterisierung der Raver1/Raver2-PTB Interaktion	64
3.2.1	Subzelluläre Lokalisation der PTB-Bindungsmutanten in Raver1	65
3.2.2	Analyse von PTB-Bindungsmutanten im Raver2-Protein	70
3.3	Beteiligung von Raver1 an PTB-vermittelten Spleißprozessen	76
3.3.1	Vergleichende Analysen von Wildtyp- und Raver1-defizienten Mäusen in Bezug auf alternative Spleißvarianten von sechs PTB-Zielgenen	78
3.3.1.1	α -Tropomyosin	87
3.3.1.2	c-src	88
3.3.1.3	FGF-Rezeptor2	89
3.3.2	Zelluläre Analysen zum direkten Einfluss von PTB und Raver1 auf das Spleißen von α -Tropomyosin, c-src und FGF-Rezeptor2	91
3.3.2.1	α -Tropomyosin	93
3.3.2.2	c-src	95
3.3.2.3	FGF-Rezeptor2	97
3.3.3	Vergleichende Betrachtung der Korrelation zwischen initialer relativer Verteilung alternativer Spleißvarianten und den beobachteten Verschiebungen im Spleißverhältnis nach negativer Modulation der Raver1-Expression	99
3.3.4	Untersuchungen zum alternativen Spleißen des Fas-Rezeptors-Gens <i>in vivo</i> und anhand von Minigenen	108
3.3.4.1	<i>In vitro</i> Spleiß-Analysen des Fas-Rezeptors durch Minigene	109
3.3.4.2	Spleißmuster des Fas-Rezeptors in Raver1-defizienten Mäusen	111

3.3.4.3	Modulation des alternativen Spleißens der Fas-Rezeptor mRNA in humanen Zelllinien durch RNA-Interferenz von PTB und Raver1	112
4	Diskussion	115
4.1	Die RNA-Bindung durch Raver1 <i>in vitro</i>	115
4.2	Die Interaktion von Raver-Proteinen mit PTB	118
4.3	Raver1 als Modulator alternativer Spleißprozesse	121
4.3.1	Minigene und <i>in vivo</i> Analysen im Vergleich	122
4.3.2	Der Einfluss von Raver1 auf drei PTB-Zielgene <i>in vivo</i>	124
4.3.2.1	c-src	126
4.3.2.2	α -Tropomyosin	128
4.3.2.3	FGF-Rezeptor2	130
4.3.3	Die Verschiebung alternativer Spleißmuster durch Raver1	133
4.4	Ausblick	135
5	Anhang	138
5.1	Literaturverzeichnis	138
5.2	Abbildungsverzeichnis	150
5.3	Tabellenverzeichnis	152
5.4	Verwendete Oligodesoxynukleotide	153
5.5	Verwendete Konstrukte	157

Danksagung

Abkürzungen

α - (in Verbindung mit Antikörpern)	anti-
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BiPro	Birkenprofilin
bp	(engl.) Basenpaare
BSA	(engl.) Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
cDNA	„complementary“ DNA
CELF	„CUGBP & ETR-3 like factors“
CLIP	„UV-crosslinking and immunoprecipitation“
CT	„threshold“-Zyklus
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DMEM	“Dulbecco’s modified eagle medium”
DNA	(engl.) Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSCAM	„Down syndrome cell adhesion molecule“
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemoluminescence“
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESE	„exonic splicing enhancer“
ESS	„exonic splicing silencer“
FCS	(engl.) Fötales Kälberserum
FGF-R2	„fibroblast growth faactor receptor2“
FRET	„fluorescence energy transfer“

GABA	(engl.) Gamma-Aminobuttersäure
GABA-R γ 2	GABA _A -Rezeptor gamma2
ggf.	gegebenenfalls
GFP	(engl.) grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure
Hom	Homozygot
hnRNP	„heterogenous nuclear ribonucleoprotein“
HRP	(engl.) Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
LB	Luria Bertani Broth
Log	Logarithmus (Basis 2)
LRR	Leucinreiche Region
LTP	„long term potentiation“
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRES	„internal ribosomal entry site“
ISE	„intronic splicing enhancer“
ISS	„intronic splicing silencer“
kDa	kilo Dalton
KO	„knock out“
MCS	„multiple cloning site“
MOPS	3-[N-morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA
NES	(engl.) Kernexportsequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NLS	(engl.) Kernlokalisationssequenz
NM-Exon	Nicht-Muskel Exon
NMD	„nonsense-mediated mRNA decay“
nPTB	neuronaes PTB
N-Terminus	Aminoterminus
nt	Nukleotide
OD _x nm	Optische Dichte bei $x = \lambda$ Nanometern

ORF	(engl.) offenes Leseraster
PBS	(engl.) Phosphat-gepufferte Saline
PCR	(engl.) Polymerasekettenreaktion
PFA	(engl.) Formaldehyd-Lösung
pI	Isoelektrischer Punkt
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PNC	„perinucleolar compartments“
PPT	„polypyrimidine tract“
PTB	„polypyrimidine tract-binding protein“
PTBtr	trunkiertes PTB
qPCR	quantitative „real-time“ PCR
RNA	(engl.) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	(engl.) Umdrehungen pro Minute
RRM	„RNA recognition motif“
RT	Reverse Transkription
SDS	(engl.) Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SM-Exon	(engl.) Glattmuskel-Exon
siRNA	„short interfering“ RNA
snRNP	„small nuclear ribonucleoprotein“
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TBS-X	Tris-gepufferte Salzlösung mit Triton-X-100-Zusatz
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
Tpm1	α -Tropomyosin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat-Lösung
ü.N.	über Nacht

U2AF	„U2 auxiliary factor“
UTR	(engl.) untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
well	(engl.) Vertiefung
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactosid
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Auf Grund der Primärsequenz von drei N-terminalen RNA-Bindungsmotiven (RRMs) wurde das Protein Raver1 der Familie der „heterogeneous nuclear ribonucleoproteins“ (hnRNPs) zugeordnet, obwohl für Raver1 bisher keine direkte Interaktion mit RNA-Molekülen nachgewiesen werden konnte. Über Assoziation mit dem spezifischen Spleißfaktor „polypyrimidine-tract binding protein“ (PTB) könnte Raver1 jedoch in die Prozessierung von RNA eingebunden sein und hier als Co-Repressor von PTB wirken, in dem Raver1 die repressive Wirkung von PTB auf alternativ inkorporierte Exons verstärkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst durch biochemische Analysen erstmals nachgewiesen, dass die RRM von Raver1 sowie des verwandten Proteins Raver2 prinzipiell in der Lage sind, an RNA zu binden. Weshalb die Gesamtproteine dennoch keine Wechselwirkung mit RNA *in vitro* zeigen bleibt weiterhin zu klären. Durch Analyse von chimären Fusionsproteinen konnte zumindest ausgeschlossen werden, dass die C-Termini der Raver-Proteine einen inhibitorischen Einfluss auf die Assoziation mit RNA nehmen. Letztere erfolgt indirekt über den Raver-Liganden PTB, und es konnte die Bildung entsprechender trimerer Komplexe *in vitro* sowohl für Raver1 als auch Raver2 gezeigt werden. Für die direkte Bindung an PTB ist in beiden Proteinen im Wesentlichen ein einzelnes Bindungsmotiv mit der Aminosäuresequenz SLLGxxP entscheidend, für das in der vorliegenden Arbeit erstmals für Raver1 gezeigt werden konnte, dass Mutationen in diesem Motiv die PTB-vermittelte Rekrutierung des Proteins in so genannte „perinucleolar compartments“ negativ beeinträchtigen.

Durch vergleichende Analysen von Spleißmustern verschiedener PTB-Zielgene in Raver1-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren wurde erstmals gezeigt, dass eine Modulation der Raver1-Expression auch *in vivo* einen Einfluss auf PTB-vermittelte Spleißprozesse hat. Untersuchungen an sechs PTB-Zielgenen mittels quantitativer „real-time“-PCR zeigten tatsächlich Verschiebungen in den Verhältnissen der alternativen Isoformen der Gene α -Tropomyosin, c-src und FGF-Rezeptor2, die durch weiterführende Untersuchungen an den humanen Zelllinien HeLa und HEK bestätigt wurden. Allerdings konnten sowohl in der Maus als auch in den Zelllinien nicht alle Veränderungen mit der postulierten Co-Repressor-Theorie in Einklang gebracht werden. Insgesamt implizieren diese Daten somit eine Beteiligung von Raver1 an alternativen Spleißprozessen, wobei der Verlust des Raver1-Proteins jedoch nicht eine universell co-repressive Wirkung auf die Zielgene des Spleißfaktors PTB ausübt.

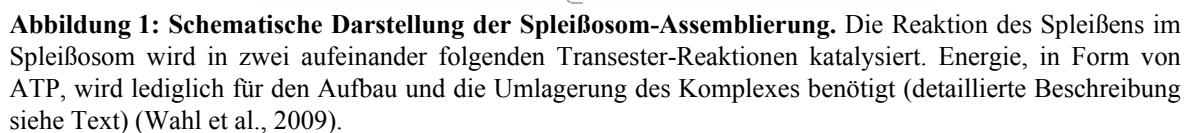
1 Einleitung

Basierend auf den Analysen im Rahmen des humanen Genomprojekts wird derzeit die Anzahl der Protein-kodierenden Gene des Menschen auf etwa 20.000-26.000 geschätzt (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001, Harrison et al., 2002; Consortium, 2004). Diese Zahl ist deutlich geringer als ursprünglich angenommen, und der Mensch besitzt somit nur etwa doppelt so viele Gene wie die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (ca. 13600 Gene, Adams et al., 2000). Selbst das Bakterium *Escherichia coli* weist eine vergleichsweise hohe Anzahl an Genen (4.600) auf (Blattner et al., 1997; Serres et al., 2001). Die im Laufe der Evolution zunehmende Komplexität von Organismen lässt sich somit nicht durch eine entsprechende Zunahme der Gesamtgenzahl erklären. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Genomen verschiedener Organismen ist allerdings die jeweilige Gendichte: Während bei Prokaryoten in der Regel etwa 900 Gene pro 1 Million Basenpaare kodieren, sind beim Menschen lediglich 10 Gene in der gleichen Anzahl Nukleotide enthalten (Graveley, 2001). Dies ist vor allem durch den diskontinuierlichen Aufbau von eukaryotischen Genen zu erklären, bei denen kodierende Genabschnitte (Exons) durch nicht-kodierende Genabschnitte (Introns) voneinander getrennt sind. Im Gegensatz zu Prokaryoten, in denen die transkribierte RNA gleichzeitig als mRNA für die Translation fungiert, muss das primäre Transkript in eukaryotischen Zellen zunächst dahingehend prozessiert werden, dass intronische Sequenzen herausgeschnitten werden und eine mRNA generiert wird, die in eine kontinuierliche Aminosäuresequenz übersetzt werden kann (Chow et al., 1977; Sharp, 1994; Sharp, 2005). Im Laufe der Evolution ist darüber hinaus eine Zunahme der Anzahl intronischer Sequenzen pro Gen zu beobachten. Beim Menschen bestimmen beispielsweise die nicht-kodierenden Sequenzen ca. 98% der Gesamt-RNA (Lander et al., 2001; Kondrashov & Koonin, 2003; Xing & Lee, 2007).

Die Entfernung intronischer Sequenzen wird als „Spleißen“ bezeichnet. Dabei sind die meisten Eukaryoten außerdem in der Lage, die Exons einzelner Gene unterschiedlich zu kombinieren, so dass verschiedene Spleißvarianten eines Proteins generiert werden können (Loraine et al., 2002). Die als alternatives Spleißen bezeichnete differenzielle Inkorporation von Exonen ermöglicht somit, dass aus einer relativ kleinen und definierten Anzahl von Genen ein um ein Vielfaches größeres Proteom entstehen kann. Es ist daher anzunehmen, dass sich die Komplexität von Organismen weniger in der eigentlichen Genomgröße ausdrückt, sondern vielmehr durch die Vielfalt des daraus generierten Proteoms gekennzeichnet ist (Graveley, 2001).

Beim konstitutiven Spleißen muss zunächst zwischen verschiedenen Spleißarten differenziert werden: dem autokatalytischen Spleißen (Kruger et al., 1982), enzymatischem tRNA Spleißen (Abelson et al., 1998) und dem Spleißen mittels Spleißosoms (Lamond, 1993; Will & Lührmann, 2001).

Die meisten eukaryotischen Spleißprozesse erfolgen Sequenz-abhängig durch einen regulativen Proteinkomplex, das so genannte Spleißosom im Zellkern (Lamond, 1993; Wahl et al., 2009). Mehr als 95% aller eukaryotischen Introns werden dabei durch das so genannte Hauptspleißosom („major spliceosome“) prozessiert, dessen Mechanismus in Abbildung 1 dargestellt ist (Staley & Guthrie, 1998).



Das Hauptspleißosom besteht aus den fünf snRNPs („small nuclear ribonucleoprotein particles“): U1, U2, U4, U5, U6 (Reed & Palandjian, 1997) sowie weiteren, bis zu über dreihundert assoziierten Proteinen (Neubauer et al., 1998; Rappsilber et al., 2002; Zhou et al., 2002; Chen et al., 2007). Die Masse eines assemblierten Spleißosoms liegt somit bei über 1 Mega Dalton, was bereits auf die hohe Komplexität und Diversität von Spleißprozessen schließen lässt. Durch sequenzielle Rekrutierung der snRNPs an die zu spleißende RNA wird diese zunächst korrekt positioniert, so dass letztendlich in einem der Gruppe II-Introns analogen Prozess das Intron unter Bildung eines so genannten „Lariats“ herausgeschnitten wird. Eingeleitet wird die RNA-Prozessierung mit der Bildung des so genannten E-Komplexes, in dem das U1-snRNP mittels Basenpaarung an die charakteristische GU-Sequenz der 5'-Spleißstelle bindet. An der 3'-Spleißstelle des Introns befinden sich ebenfalls drei konservierte Sequenzabschnitte, die für die Bildung des Spleißosoms von Bedeutung sind: der so genannte „branch point“, gefolgt von einem „polypyrimidine-tract“ (PPT) sowie eine terminale, das Intron begrenzende AG-Sequenz. Diese Abschnitte werden entsprechend spezifisch vom Spleißfaktor1 (SF1) sowie den Untereinheiten 65 und 35 des U2AF („U2 auxiliary factor“) gebunden. Im Anschluss bildet sich der A-Komplex durch die Bindung des U2-snRNP an den „branch point“. Der Eintritt des prä-assemblierten tri-snRNP-Komplexes (U4/U5/U6) markiert den B-Komplex, innerhalb dessen es zu Umlagerungen zwischen den RNA/RNA-Bindungen kommt, die die beiden Intron-Exon-Übergänge in räumliche Nähe zueinander bringt. Im weiteren Verlauf werden die bereits bestehenden RNA-RNA-Interaktionen zwischen den U4- und U6-snRNPs unterbrochen, und die U6-snRNP bindet spezifisch die 5'-Spleißstelle. U1-snRNP wird somit verdrängt und verlässt zusammen mit U4-snRNPs das Spleißosom (Berglund et al., 1998; Mollet et al., 2006).

Die sequenzielle Bildung der A- und B-Komplexe dient vor allem der korrekten Positionierung der zu spleißenden RNA. Erst beim sich schließlich bildenden C-Komplex spricht man von einem aktiven Spleißosom, da erst hier die katalytische Entfernung des Introns erfolgt. Das Herausschneiden der Intronsequenz beruht dabei auf zwei aufeinander folgenden Transester-Reaktionen. Im ersten Schritt attackiert die OH-Gruppe des „branch point“-Adenosins die 5'-Spleißstelle, was zur Ausbildung einer zirkulären Intronstruktur, dem Lariat, führt. Die zweite Transester-Reaktion führt zur Spaltung der 3'-Spleißposition unter gleichzeitiger Verknüpfung der flankierenden Exons, wobei das Intron als Lariat ausgeschnitten wird. Nach Entfernung des Introns und Dissoziation des C-Komplexes stehen alle beteiligten Komponenten für einen erneuten Spleißvorgang zur Verfügung (Staley & Guthrie, 1998; Will & Lührmann, 2001; Makarov et al., 2002).

1.2 Alternative Spleißprozesse

Aus den maximal 26.000 Protein-kodierenden Genen des Menschen werden bis zu 250.000 verschiedene Proteine exprimiert (Consortium, 2004). Diese beeindruckende Amplifikation wird durch den Prozess des alternativen Spleißens ermöglicht, der für bis zu 94% aller humanen Gene postuliert wurde (Maniatis et al., 2002; Roberts & Smith, 2002; Johnson et al., 2003; Clark et al., 2007; Wang et al., 2008).

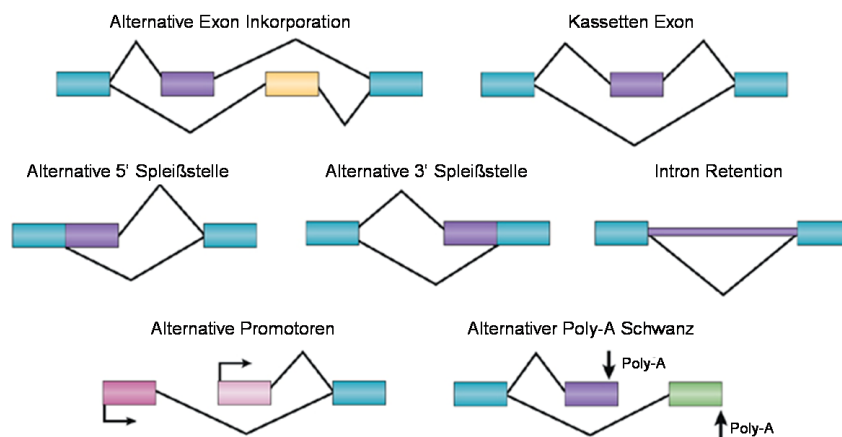


Abbildung 2: Schematische Darstellung alternativer Spleißprozesse. Konstitutiv gespleißte Exons sind in Blau dargestellt. Die Integration alternativer Exons in die mRNA ist in den Farben Lila und Gelb dargestellt. Rosé-farbene Exons kennzeichnen deren Inkorporation über alternative Promotorsequenzen, in Grün ist die alternative Polyadenylierung hervorgehoben (modifiziert nach Li et al., 2007).

Alternative Spleißprozesse lassen sich in verschiedene Typen unterteilen (Abbildung 2). Die häufigste Form beim Menschen stellt mit etwa 53% das so genannte Kassettenexon dar (Stamm et al., 2000). Dabei wird alternativ ein einzelnes Exon entweder in die mRNA integriert oder mit den flankierenden Introns herausgespleißt. Ein weiterer, häufig vorkommender Prozess ist die alternative Inkorporation zweier oder mehrerer Exons, wobei meist gewebespezifisch nur ein Exon inseriert wird. Durch die Wahl verschiedener 3'- und 5'-Spleißstellen, sowie unterschiedlicher Promotoren oder alternativer Positionierung der Polyadenylierung wird die Vielfalt an alternativen Spleißprozessen weiter vergrößert (Wang & Burge, 2008). In manche mRNAs werden sogar Introns komplett integriert - diesen Spleißtyp bezeichnet man als „Intron Retention“ (Sakabe & de Souza, 2007). Eine einzelne prä-mRNA kann außerdem multiple Spleißstellen besitzen, die jeweils unterschiedlichen Spleißmechanismen folgen. In einer einzelnen Zelle kann somit das Spleißen derselben prä-mRNA in von ihrer Exonstruktur her unterschiedliche mRNAs erfolgen, so dass die parallele Expression verschiedener Spleißvarianten in derselben Zelle ermöglicht wird (Lopez

et al., 1998). Die Entscheidung über Insertion oder Ausschluss eines alternativen Exons in eine mRNA kann für das daraus exprimierte Protein weitreichende strukturelle und funktionelle Folgen haben (Stamm et al., 2005). Ein Extrembeispiel der Kombination alternativer Spleißprozesse ist sicherlich das Drosophila-Homolog des humanen DSCAM-Gens („Down syndrome cell adhesion molecule“) ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie: über 38.000 verschiedene Isoformen können theoretisch durch entsprechend variable RNA-Prozessierung aus diesem Gen generiert werden (Schmucker et al., 2004).

Gelegentlich unterscheiden sich zwei Isoformen nur durch wenige Nukleotide. Bei der Tyrosinkinase c-src kommt es beispielsweise durch Inkorporation eines lediglich 18 Nukleotide umfassenden Kassettenexons (N1) zur Expression der neuronalen Variante dieses Proteins (Levy et al., 1987). Interessanterweise schafft es die Spleißmaschinerie trotz der kurzen Intron-Exon Übergänge zwischen kurzen Exonen und langen Introns exakt zu unterscheiden. Ursache hierfür sind weitere cis-aktive Elemente, die sowohl in flankierenden Introns, als auch in den Exonen selbst vorkommen (Abbildung 3). Diese Elemente sind unumgänglich für ein korrektes Inserieren („intronic/exonic splicing enhancers“; ISE/ESE) oder Herausschneiden eines Exons („intronic/exonic splicing silencers“; ISS/ESS) und beeinflussen somit das alternative Spleißen des betreffenden RNA-Moleküls (Matlin et al., 2005; Chasin, 2007). Gekennzeichnet sind die regulatorischen Elemente durch kurze Abfolgen (5-8 nt) Purin-reicher, Pyrimidin-reicher oder A/C-reicher Nukleotide (Zheng et al., 2004).

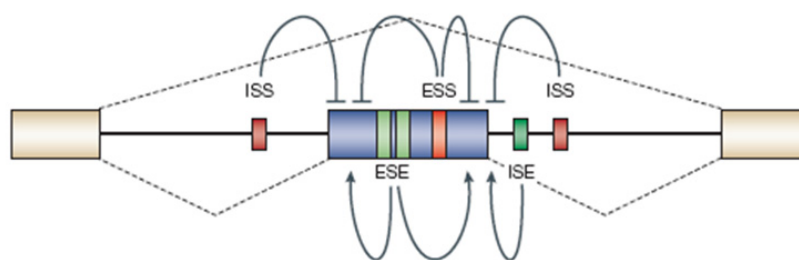


Abbildung 3: Regulatorische Elemente alternativer Spleißprozesse. Akzessorische Sequenzen sind erforderlich, die als „enhancer“ die Inkorporation eines Exons begünstigen oder als „silencer“ dessen Einbau verhindern. ISS = „intronic splicing silencer“; ESS = „exonic splicing silencer“; ISE = „intronic splicing enhancer“; ESE = „exonic splicing enhancer“ (aus Matlin et al., 2005).

Die Präzision alternativer Spleißprozesse hängt letztendlich von Proteinen ab, die an diese cis-aktiven Elemente binden und dadurch das Spleißverhältnis in die eine bzw. andere Richtung verschieben. Unterteilen lassen sich diese Proteine im Wesentlichen in zwei Gruppen – die so genannten SR-Proteine sowie die Proteinfamilie der „heterogeneous nuclear

ribonucleoproteins“ (hnRNPs). Alle Vertreter dieser Gruppen besitzen charakteristische RNA-Bindungsdomänen und sind in verschiedene RNA-assoziierte Prozesse (Prozessierung, Stabilisierung, Transport, Translation) involviert (Ma et al., 2003; Pozzoli & Saroni, 2005; Martinez-Contreras et al., 2007). Bei alternativen Spleißprozessen können SR-Proteine und hnRNPs unter anderem als Antagonisten fungieren und um die Bindung an die beschriebenen regulatorischen cis-Elemente konkurrieren. Das letztendliche Spleißergebnis wird somit nicht allein durch die Nukleotidsequenz bestimmt, sondern es ist vor allem auch von der zellulären Komposition und Konzentration einzelner Spleißfaktoren abhängig (Hanamura et al., 1998; Yeo et al., 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Spleißprozesse betrachtet, für die angenommen wird, dass sie durch die Aktivität des spezifischen Spleißfaktors „polypyrimidine tract-binding protein“ (PTB) reguliert werden.

1.3 Das „polypyrimidine tract-binding protein“

Das „polypyrimidine tract binding protein“ (PTB) das auch als hnRNP I bezeichnet wird, ist ein ubiquitär exprimiertes 57 kDa Protein, welches zur hnRNP-Familie gehört, die derzeit etwa 30 bekannte Mitglieder umfasst (Singh & Valcarcel, 2005). Die RNA-Bindung wird bei hnRNPs vorrangig über eine oder mehrere charakteristische RNA-Bindungsdomänen vermittelt, die als „RNA Recognition Motifs“ (RRM) bezeichnet werden und eine charakteristische $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Struktur aufweisen (Krecic & Swanson 1999; Clery et al., 2008). Kernstück der durchschnittlich 90 nt umfassenden RRM-Domänen sind so genannte RNP-Motive. Diese RNP-Motive umfassen die beiden Konsensus-Sequenzen RNP1 und RNP2, die in einem Abstand von etwa 30 nt voneinander innerhalb einer RRM lokalisieren (Siomi & Dreyfuss, 1997; Maris et al., 2005).

PTB besitzt vier über das Protein verteilte RRM-Domänen, wobei eine zentrale „Linker“-Region die zwei N-terminalen RRM von den zwei C-terminalen RRM trennt (**Abbildung 4**). In der „Linker“-Region liegt Exon9 des PTB-Gens, das zwei alternative 3'-Spleißstellen beinhaltet. Durch komplettes Herausspleißen von Exon9 entsteht die kürzeste Isoform, PTB1, während die Inkorporation von Exon9 unter Berücksichtigung der alternativen 3'-Spleißstellen zur Bildung der Isoformen PTB2 und PTB4 führt, welche durch 19 oder 26 zusätzliche Aminosäuren in der „Linker“-Region gekennzeichnet sind (Gil et al., 1991; Wollerton et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit PTB1 gearbeitet, welches im Folgenden lediglich als PTB bezeichnet wird.

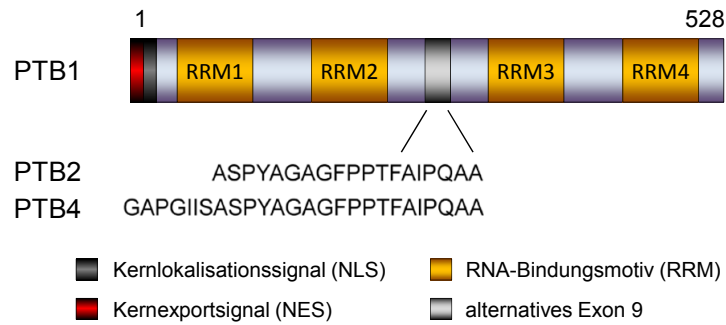


Abbildung 4: Schematische Darstellung des „polypyrimidine tract-binding protein“ (PTB). Zwei N-terminale RRM-Domänen sind durch eine „Linker“-Region von den C-terminalen RRM-Domänen getrennt. In dieser „Linker“-Region befindet sich das Exon9, welches durch alternative 3'-Spleißstellen die Isoformen PTB2 und PTB4 generieren kann und deren zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zum PTB1 unter dem Diagramm abgebildet sind. Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine bipartite NLS, die mit einem Kernexportsignal überlappt. In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich das aus 528 Aminosäuren bestehende PTB1 verwendet und daher als PTB bezeichnet (modifiziert aus Wagner & Garcia-Blanco, 2001 und Wollerton et al., 2001).

Die RNA-Bindung kann prinzipiell über jede der vier RRM-Domänen erfolgen (Oberstrass et al., 2005; Auweter & Allain, 2008) wobei jedoch die Bindungsaffinität der Deletionskonstrukte gegenüber dem Gesamtprotein deutlich abnimmt (Perez et al., 1997). Ursprünglich wurde PTB als ein Spleißfaktor beschrieben, der an intronische, uracilreiche Sequenzen bindet (Garcia-Blanco et al., 1989; Patton et al., 1993). Mittlerweile geht man davon aus, dass PTB überwiegend in alternative Spleißprozesse involviert ist und hierbei vorrangig als Repressor verschiedener Exons fungiert (Spellman et al., 2005). Darüber hinaus scheint PTB auch in weitere, RNA-assoziierte Prozesse eingebunden zu sein. So konnte nicht nur eine Beteiligung an der Polyadenylierung von prä-mRNA gezeigt werden (Castelo-Branco et al., 2004), sondern auch, dass PTB die Stabilität von mRNA sowie deren cytoplasmatische Lokalisation beeinflussen kann (Cote et al., 1999; Hamilton et al., 2003). Im Kontext viraler Infektionen ist PTB darüber hinaus in cytoplasmatische IRES-vermittelte Translationsprozesse eingebunden (Pilipenko et al., 2001; Mitchell et al., 2005). Insgesamt belegen die bisherigen Untersuchungen, dass PTB ein Multifunktionsprotein ist, das in seinen Funktionen nicht auf Kern-lokalisierte Prozesse beschränkt ist (Sawicka et al., 2008). Die Translokation von PTB zwischen Kern und Cytoplasma wird unter anderem durch zwei Signalsequenzen vermittelt. Der N-Terminus des Proteins beinhaltet eine bipartite Kernlokalisationssequenz (NLS) die mit einer Kernexportsequenz (NES) überlappt (Romanelli et al., 1997; Li & Yen, 2002). Die genauen Regulationsmechanismen sind nicht bekannt, aber es wird eine Regulation durch Phosphorylierung innerhalb der NES angenommen, die eine cytoplasmatische Anreicherung des Proteins begünstigt (Xie et al., 2003). In der Regel ist PTB jedoch vorrangig frei im Nukleoplasma des Zellkerns lokalisiert.

Darüber hinaus liegt PTB in so genannten „perinucleolar compartments“ (PNC) vor (Ghetti et al., 1992; Matera et al., 1995; Huang et al., 1997). Diese durch konzentrierte Mengen an PTB charakterisierten Kompartimente sind dynamische Strukturen, die überwiegend in transformierten Zellen und verschiedenen Krebsgeweben zu finden sind. Ihre zelluläre Funktion ist bis heute nicht genau bekannt (Huang et al., 1998; Wang et al., 2003). Möglicherweise dienen sie als Reservoir im „RNA trafficking“ neu synthetisierter RNAs (Kopp & Huang, 2005). Neuste Studien sehen PNCs auch als Marker für die Malignität von Tumoren (Slusarczyk & Huang, 2008).

Von allen Funktionen, die PTB derzeit zugeschrieben werden, ist bisher die Beteiligung des Proteins an alternativen Spleißprozessen am besten beschrieben. Für letztere scheint insbesondere die RRM4 von PTB von besonderer Bedeutung zu sein (Liu et al., 2002). Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass PTB als Repressor verschiedener Exons fungiert. Das heißt durch die Bindung von PTB an inhibitorische cis-regulatorische Sequenzen (siehe Abbildung 3) wird die Inkorporation des durch diese Sequenzen regulierten Exons verhindert (Wagner & Garcia-Blanco 2001; Amir-Ahmady et al., 2005). Die spezifische Bindung von PTB erfolgt meist an polypyrimidin-reiche Sequenzen, die das zu reprimierende Exon flankieren (ISS). Diese polypyrimidin-reichen Sequenzen bestehen aus multiplen Kopien der PTB-Bindungsmotive UCUU, CUCUCU und UUCUCU (Liu et al., 2002). Durch die Bindung von PTB an diese „polypyrimidine tracts“ nahe des „branch points“ kommt es zu einer Verdrängung des in das konstitutive Spleißen eingebundenen Faktor U2AF (siehe Abbildung 2; Lin & Patton, 1995; Singh et al., 1995). Allerdings kann die PTB-Repression von Exonen nicht auf eine einfache Konkurrenz zwischen PTB und dem U2AF reduziert werden, denn die Exon-Repression durch PTB benötigt häufig ein kooperatives Binden mehrerer PTB-Moleküle an verschiedenen Positionen (Wagner et al., 2005). Diese Bindungsstellen stehen oft in keiner Verbindung mit intronischen polypyrimidin-reichen Abschnitten (Wagner & Garcia-Blanco, 2001) und konnten sogar innerhalb des zu spleißenden Exons (ESS) nachgewiesen werden (Shen et al., 2004; Izquierdo et al., 2005).

Es existieren mehrere Modellvorstellungen, wie PTB seine Repressorfunktion in alternativen Spleißprozessen ausübt. Wie bereits erwähnt und in Abbildung 5 A dargestellt kann PTB in direkter Konkurrenz zu U2AF um einen intronischen Polypyrimidin-Bereich stehen. Dadurch wird U2AF verdrängt und das Exon wird nicht in die mRNA integriert. Des Weiteren können Komplexe aus mehreren PTB-Molekülen das betroffene Exon überbrücken und verdecken damit die Bindungsstellen für die Komponenten des Spleißosoms (Abbildung 5 B; Wagner & Garcia-Blanco, 2001). Das so genannte „Looping“ stellt eine weitere Möglichkeit dar ein

Exon zu reprimieren (Abbildung 5 C). Dabei kommt es zu einer Strukturveränderung in der RNA durch das Binden von mehreren PTB-Molekülen an verschiedene PTB-Bindungsstellen (Oberstrass et al., 2005). Somit können die intronischen Sequenzen nicht mehr als solche erkannt werden. Durch die Bindung von PTB an ESS-Elemente (Abbildung 5 D) ist keine direkte Bindungskonkurrenz zu U2AF gegeben. Allerdings wird die Exon-Definition gestört, die beispielsweise im alternativen Spleißen des Fas-Rezeptor Exon6 durch das Protein TIA-1 gewährleistet wird. Blockiert PTB diese Stelle, kann es zu keiner Interaktion zwischen U1 und U2AF kommen (Izquierdo et al., 2005).

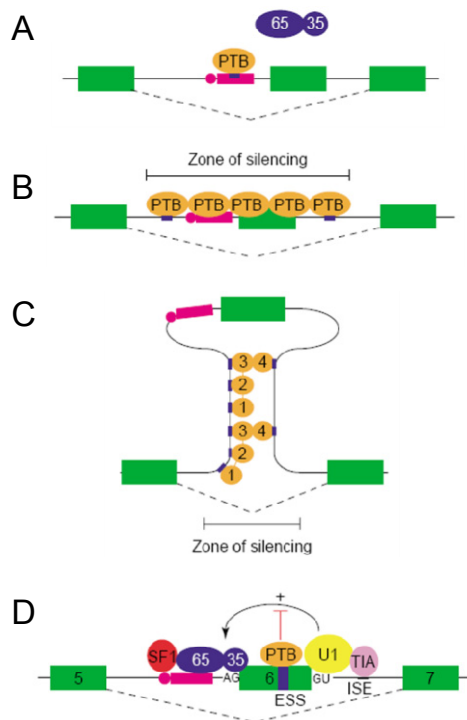


Abbildung 5: Modelle der PTB-Repression. Die Exons sind als grüne Quadere dargestellt, die flankierenden Introns sind durch dünne Linien repräsentiert. Potentielle PTB-Bindungsstellen sind als kleine blaue Kästchen abgebildet. A) Repression des Exons durch Konkurrenz von PTB und U2AF (Untereinheiten 65 und 35 dargestellt in lila) um eine Bindungsstelle. B) Maskierung eines Exons durch PTB-Proteinkomplexe. C) Schlaufenbildung eines Exons durch PTB, wodurch die Intron-Definition inhibiert wird. D) Inhibition der Exon-Definition, durch Bindung von PTB an das Exon selbst (aus Spellman & Smith, 2006).

Derzeit sind in der Literatur mindestens 16 Gene beschrieben, deren primäre Transkripte unter anderem unter Beteiligung von PTB alternativ gespleißt werden: α -Tropomyosin (Gooding et al., 1994; 1998), β -Tropomyosin (Mulligan et al., 1992), FGF-Rezeptor1 (Jin et al., 2003), FGF-Rezeptor2 (Carstens et al., 2000), α -actinin (Southby et al., 1999), c-src (Chan & Black, 1997), GABA_A Rezeptor γ 2 (Ashiya & Grabowski, 1997), NMDA-Rezeptor NR1 (Zhang et al., 1999), PTB (Wollerton et al., 2004), nPTB (Boutz et al., 2007), cTNT („cardiac troponin T“; Charlet et al., 2002), Fas-Rezeptor (Izquierdo et al., 2005), IgM (Shen et al., 2004), Fibronectin (Norton, 1994), CLCB (= „clathrin light chain B“; Zhang et al., 1999) und Calcitonin (Lou et al., 1999). Weitere PTB-Zielgene konnten in der Arbeitsgruppe von Prof. D. Black über Microarray-Experimente identifiziert werden: „Kinesin Intermediate Filament“ (Kif1b), „Bridging Integrator1“ (Bin1), Dystonin, „Stromal membraneassociated

protein1“ (Smap1), „Microtubule-Associated Protein2“ (Mtap2), Kinectin1, „Rho-Interacting Protein3“ (Rip3), Exoc1 und Annexin A7 (Boutz et al., 2007).

Das alternative Spleißen des α -Tropomyosin-Gens ist dabei vermutlich einer der am meisten untersuchten Spleißprozesse überhaupt. α -Tropomyosin (Tpm1) ist ein fibrilläres Strukturprotein, das an der Kontraktionsregulation von Muskelzellen beteiligt ist (Balvay & Fizman, 1994; Lin et al., 2008). Für PTB konnte eine Beteiligung an der gewebespezifischen, alternativen Inkorporation der benachbarten Exons 2 und 3 gezeigt werden, durch die entweder eine Glattmuskel-spezifische (Exon2; SM) oder eine Nicht-Muskel-Isoform (Exon3; NM) gebildet wird (Abbildung 6). In Glattmuskelzellen bindet PTB dabei an Polypyrimidin-reiche Sequenzen, die das Exon3 flankieren. Somit wird die Integration dieses NM-Exons in die mRNA verhindert. Infolge dessen kann durch die PTB-abhängige Repression des Exon3 die Inkorporation des Exon2 und somit die Bildung von Glattmuskel-spezifischem α -Tropomyosin erfolgen. In Nicht-Muskel-Zellen wird bevorzugt das alternative Exon3 in die mRNA integriert. Letzteres beruht überwiegend auf stärkeren 3'-Spleißelementen für Exon3 und nicht auf einer selektiven Repression von Exon2 (Gooding et al., 1994; 1998; Wagner & Garcia-Blanco, 2001). Für α -Tropomyosin konnte gezeigt werden, dass von den drei PTB-Isoformen PTB4 die höchste Repressoraktivität auf das SM-Exon hat (Wollteron et al., 2001).

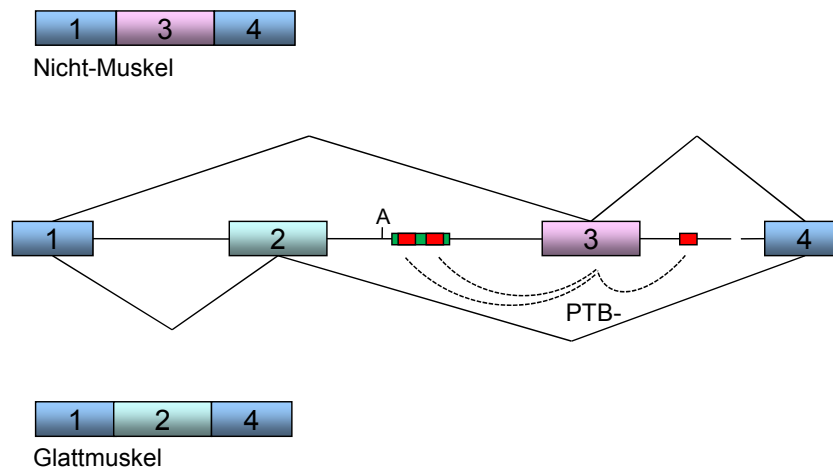


Abbildung 6: Schematische Darstellung von PTB-vermitteltem Spleißen des α -Tropomyosin-Gens. Durch Repression des Nicht-Muskel-spezifischen Exon3 (rosé) durch PTB kommt es zu einer erhöhten Inkorporation des Glattmuskel-spezifischen Exon2 (hellblau). Die konstitutiv gespleißten Exons 1 und 4 sind in der Abbildung in blau dargestellt. Die „polypyrimidine-tracts“ in unmittelbarer Nähe des „branch points“ (A) sind als grünes Kästchen gekennzeichnet. Rote Kästchen stehen für bekannte PTB-Bindungsstellen in den flankierenden Introns des Exon3. Die Repression des Exon3 durch PTB ist gekennzeichnet (PTB-) (modifiziert aus Wagner & Garcia-Blanco, 2001).

Bereits am Beispiel des alternativen Spleißens zweier Exons des α -Tropomyosin-Gens wird deutlich, dass das Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener Faktoren den letztendlichen Spleißprozess beeinflusst. Da die cis-regulatorischen Elemente durch die Nukleotidsequenz definiert und somit in allen Zelltypen gleich sind, sind es gerade die um Bindungsstellen konkurrierenden Spleißfaktoren, die eine gewebespezifische Modulation der RNA-Prozessierung ermöglichen (Cáceres & Kornblihtt, 2002). Dies impliziert, dass zum einen die zelluläre Konzentration von PTB selbst aber auch die Expression von PTB-Antagonisten und PTB-Co-Faktoren das letztendliche Spleißergebnis bestimmen. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass PTB durch alternatives Spleißen der eigenen RNA in der Lage ist, den eigenen Expressionsspiegel zu regulieren. In diesem als „Autospleißen“ bezeichneten Prozess bewirkt PTB konzentrationsabhängig die Repression von Exon11 der eigenen RNA. Das Herausspleißen von Exon11 führt zu einer Verschiebung des Leserasters in Exon12 und somit zu einem verführten Stoppcodon. Es entsteht eine verkürzte Form von PTB, das so genannte trunkierte PTB (PTBtr). Diese verkürzte Form des eigentlichen Proteins wird jedoch nicht als Protein exprimiert, sondern die RNA des PTBtr wird durch den NMD-Mechanismus (=„nonsense-mediated mRNA decay“) im Cytoplasma abgebaut (Wollerton et al., 2004). Diese Degradation der mRNA ist für alternative Isoformen nicht untypisch, da bereits gezeigt wurde, dass etwa ein Drittel aller alternativen Spleißprodukte durch NMD abgebaut werden (Lewis et al., 2003; McGlincy & Smith, 2008). Alternative Spleißprozesse können somit nicht nur verschiedene Protein-Isoformen erzeugen, sondern auch als quantitative Kontrolle der Genexpression wirken (Wang & Burge, 2008).

Eine weitere Ebene der Regulation alternativer Spleißprozesse stellen antagonistisch wirkende Spleißfaktoren dar. Für mehrere durch PTB prozessierte Gene konnte bereits gezeigt werden, dass die gewebespezifische Produktion verschiedener Isoformen auch von der relativen Expression der mit PTB konkurrierenden Spleißfaktoren abhängt. Für das PTB-Autospleißen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es in Anwesenheit des hnRNP CELF4 zu einer verstärkten Exon11-Insertion in die PTB-mRNA kommt und die PTB-Expression begünstigt wird. Eine ebenfalls antagonistische Beziehung zwischen PTB und CELF4 konnte für das alternative Spleißen der α -actinin prä-mRNA festgestellt werden (Wollerton et al., 2004). Auch für die alternative Prozessierung des α -Tropomyosin-Gens durch PTB wurde bereits ein PTB-Antagonist beschrieben, das „RNA-binding motif protein 4“ (RBM4), das mit PTB um eine CU-reiche Bindungsstelle konkurriert (Lin et al., 2005). Insgesamt konnte eine Reihe weiterer Proteine identifiziert werden, welche antagonistisch zu PTB wirken. Dazu zählen die RNA-bindenden Proteine NOVA (Polydorides et al., 2000),

TIA-1 (Izquierdo et al., 2005), Fox-1 (Jin et al., 2003), sowie das bereits erwähnte RBM4 (Lin et al., 2005) und einige Mitglieder der CELF-Proteinfamilie, darunter CELF4 (Charlet et al., 2002; Gromak et al., 2003b).

Schließlich kann die Spleißaktivität von PTB direkt durch Assoziation mit entsprechenden Co-Faktoren moduliert werden. Ein solcher Co-Faktor konnte erstmals 2003 identifiziert werden (Gromak et al., 2003a). Analysen an Minigen-Konstrukten des α -Tropomyosin-Gens zeigten, dass in transfizierten PAC-1-Zellen die repressive Wirkung des PTB auf das Nicht-Muskel spezifische Exon3 verstärkt wurde, wenn die Zellkulturen gleichzeitig mit Raver1, einem PTB-bindenden Protein (Hüttelmaier et al., 2001) transfiziert waren, über dessen zelluläre Bedeutung zu jenem Zeitpunkt noch nichts bekannt war.

1.4 Raver1

Ursprünglich wurde das Raver1-Protein in „Yeast Two-Hybrid Analysen“ als Ligand der Mikrofilament-assoziierten Proteine Vinculin, Metavinculin und α -actinin identifiziert (Hüttelmaier et al., 2001). Es handelt sich um ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 80 kDa (748 Aminosäuren in der Maus, Abbildung 7). Vergleichende Datenbank-Analysen haben gezeigt, dass die Expression von Raver1 auf Vertebraten beschränkt ist (Hüttelmaier et al., 2001).

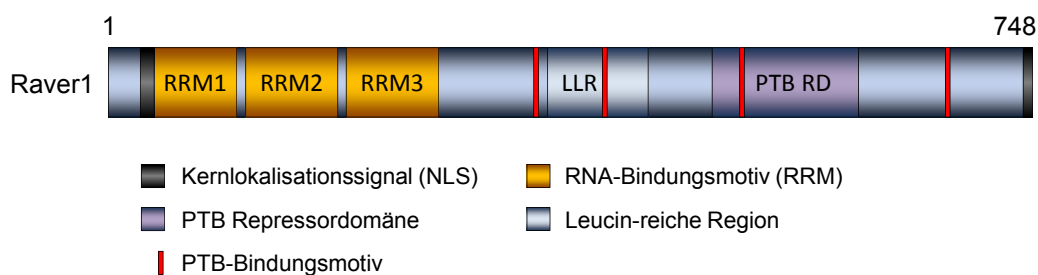


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Raver1-Proteins. Das aus 748 Aminosäuren bestehende Protein besitzt neben seinen drei N-terminalen RRM (orange) je eine N- und C-terminale NLS (schwarz) sowie eine zentrale Leucin-reiche Region (hellgrau). Im C-terminalen Bereich lokalisiert außerdem die PTB-Repressordomäne (lila). Vier rote über das Protein verteilte Balken, stellen die Bindungsmotive des Raver1-Proteins für PTB dar.

Raver1 besitzt drei N-terminale RRM-Domänen, deren RNP-Motive sehr hohe Homologien mit RNP-Motiven von Mitgliedern der hnRNP-Familie aufweisen, vor allem mit den RRM des „embryonic lethal abnormal visual system (ELAV)-like protein“ (HuR) und dem „PTB-associated splicing factor“ (PSF; Maris et al., 2005, Dissertation B. Henneberg, 2006).

Allerdings ist die Konzentration von drei RRM's im N-Terminus einzigartig, so dass Raver1 zwar prinzipiell als hnRNP klassifiziert werden kann, eine weitere Zuordnung zu einer bereits beschriebenen Untergruppe dieser Familie jedoch nicht möglich ist.

In den meisten bisher untersuchten Zellen und Geweben lokalisiert das Raver1-Protein vorrangig im Zellkern und konnte hier als direkter Interaktionspartner von PTB identifiziert werden (Hüttelmaier et al., 2001). Heterokaryon-Analysen haben jedoch gezeigt, dass das Protein prinzipiell in der Lage ist, zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln, wobei die zu Grunde liegenden regulatorischen Mechanismen dieser nukleo-cytoplasmatischen Translokation noch nicht geklärt sind (Hüttelmaier et al., 2001; Diplomarbeit K. Falley, 2004). Der Kernimport könnte durch zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) vermittelt werden, die sich im N- und C-Terminus befinden. Eine Leucin-reiche Region im zentralen Bereich fungiert möglicherweise als Kernexportsequenz (NES; Diplomarbeit K. Falley, 2004). Eine eindeutige cytoplasmatische Lokalisation wurde für Raver1 bisher nur in Muskelgewebe festgestellt (Hüttelmaier et al., 2001; Zieseniss et al., 2007). Während der Differenzierung von C2C12-Zellen, einer Myoblasten-Zelllinie aus der Maus, kommt es zu einer Translokation von Raver1 aus dem Kern an Mikrofilament-assoziierte Strukturen des kontraktiven Apparates. Im differenzierten Skelettmuskel co-lokalisiert Raver1 mit seinen Liganden (Meta-) Vinculin und α -actinin im Bereich der Z-Linie, im Costamer-Komplex (Hüttelmaier et al., 2001), in der I-Z-I-Region und in den Glanzstreifen (Zieseniss et al., 2007). Über die Funktion von Raver1 in diesen Strukturen ist kann derzeit jedoch nur spekuliert werden (siehe unten).

Im Gegensatz dazu gibt es klare Modellvorstellungen zu einer zellulären Funktion von Raver1 im Zellkern. Bereits die Präsenz von drei RRM's hatte vermuten lassen, dass Raver1 in RNA-assoziierte Prozesse involviert sein könnte (Jockusch et al., 2003). Allerdings konnte bisher weder *in vitro* noch in eukaryotischen Zellen die direkte Bindung von Raver1 an RNA nachgewiesen werden (Dissertation B. Henneberg, 2006). Weitere *in vitro* Studien haben jedoch gezeigt, dass Raver1 in Anwesenheit seines Interaktionspartners PTB in trimeren Komplexen mit PTB und RNA co-präzipitiert werden kann und somit eine indirekte Rekrutierung von Raver1 an RNA möglich ist (Dissertation B. Henneberg, 2006). Die Assoziation mit PTB wird dabei von vier potentiellen Bindungsmotiven im Raver1-Protein vermittelt, die als Konsensus die Sequenz [S/G][I/L]LGxxP aufweisen (Rideau et al., 2006). Die vier Peptidmotive liegen alle außerhalb der drei RRM's des Raver1-Proteins (siehe Abbildung 7). Zur Untersuchung der Funktionalität dieser Motive für die Assoziation mit PTB wurden Raver1-Peptid-Mutanten generiert, bei denen Leucinreste gegen Alaninreste im

zentralen Bereich der Bindungsmotive ausgetauscht wurden. Dabei konnte bei allen verwendeten Peptid-Mutanten eine signifikante Reduktion der Assoziation von Raver1 und PTB beobachtet werden. Eine Mutation aller vier Motive im Gesamt-Raver1-Protein zeigte ebenfalls eine stark reduzierte Interaktion mit PTB (Rideau et al., 2006). NMR-Spektroskopie-Analysen („nuclear magnetic resonance“) gaben darüber hinaus erste Hinweise zur räumlichen Anordnung von Raver1, PTB und RNA. Sie zeigten, dass das in den Versuchen verwendete PTB-RRM2-Konstrukt sowohl RNA als auch Raver1 (repräsentiert durch ein dem dritten Bindungsmotiv entsprechenden Peptid, Aminosäuren: 496-507) simultan an gegenüberliegenden Seiten binden kann (Rideau et al., 2006; Abbildung 8).

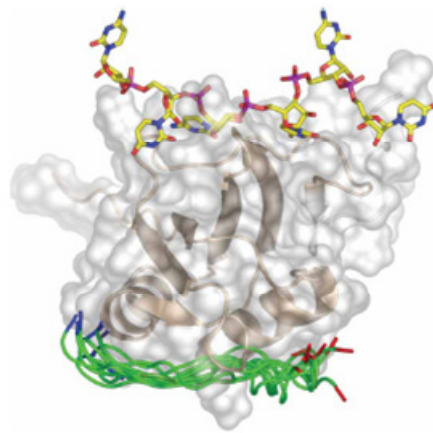


Abbildung 8: Modellvorstellung eines trimeren Raver1-PTB-RNA Komplexes. Im Strukturmodell ist die Interaktion eines Raver1-Peptids (Aminosäuren: 496-507, grüner Bereich) mit der RRM2 des PTB-Proteins (grau) und RNA-Molekülen (Stabmodell) dargestellt. Mögliche Konformationen des Raver1-Peptids mit der PTB-RRM2 sind als grüne Bänder auf Grundlage von NMR-Analysen abgebildet, wobei blaue Enden den N-Terminus des Peptids - rote Enden den C-Terminus des Peptids darstellen. Der trimere Komplex zeigt die simultane Interaktion der PTB-RRM2 mit Raver1 und RNA-Molekülen an gegenüberliegenden Seiten (aus Rideau et al., 2006).

Aufgrund der Interaktion von Raver1 und PTB wurde eine mögliche modulierende Funktion von Raver1 bei PTB-vermittelten alternativen Spleißprozessen diskutiert. Systematisch wurde dies erstmal anhand von Minigen-Analysen in PAC-1-Zellen untersucht (Gromak et al., 2003). Diese Zellen wurden mit einem die ersten vier Exons umfassenden Minigen-Konstrukt des α -Tropomyosin-Gens transfiziert und auf die alternative Inkorporation der Exons 2 und 3 in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Raver1 hin untersucht. Es zeigte sich, dass Raver1 die PTB-vermittelte Repression von Exon3 des α -Tropomyosin-Gens verstärkt und dadurch die Erzeugung der Glattmuskel-spezifischen Tropomyosin-Isoform begünstigt, die das alternative gespleißte Exon2 enthält (siehe auch Abbildung 6). Darüber hinaus konnte in Raver1-„Pulldown“-Experimenten eine minimale Repressordomäne von 138 Aminosäuren im

Raver1-Protein identifiziert werden (AS 492-629), die essentiell für die verstärkende Wirkung von Raver1 auf die PTB-vermittelte Repression des Exon3 von α -Tropomyosin ist (Rideau et al., 2006). In weiteren Minigen-Analysen konnte *in vitro* eine ebenfalls co-repressive Wirkung von Raver1 auf die Inkorporation von Exon6 des Fas-Rezeptors in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Izquierdo et al., 2005). Ein entsprechend modulativer Einfluss von Raver1 auf endogene, durch PTB regulierte Spleißprozesse wurde jedoch bisher nicht publiziert.

Das Raver1-Gen konnte in der Maus durch homologe Rekombination erfolgreich inaktiviert werden (Lahmann et al., 2008). Die Raver1-defizienten Mäuse (Raver1-KO-Mäuse) sind lebensfähig und fertil und zeigen keinen auffällig veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Allerdings gibt es erste Hinweise auf eine veränderte synaptische Plastizität in den Raver1-KO-Tieren, da ältere Raver1-KO-Mäuse (6-9 Monate) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die Langzeitpotenzierung (LTP, „long-term potentiation“) weniger aufrechterhalten können, wohingegen jüngere Raver1-KO-Mäuse (P14-20) Beeinträchtigungen bei der Induktion von LTP aufweisen (Diplomarbeit Daniel Minge, 2006, Lahmann et al., 2008). Ersteres Phänomen ließe sich durch eine Beteiligung von Raver1 an lokalen Translationsprozessen erklären, während die Induktionsphase von LTP eher auf einer Kernfunktion von Raver1 basieren könnte. Bisher wurde allerdings keine detaillierte Analyse von Raver1 in Neuronen durchgeführt. In Primärkulturen dissoziierter Neuronen der Ratte lokalisiert das Protein jedoch überwiegend im Kern (Kleinhenz et al., 2005). Die Expression von Raver1 scheint somit für die Entwicklung des Organismus nicht essentiell zu sein, oder es kann durch funktionell redundante Proteine ersetzt werden.

Bei der Suche nach verwandten Proteinen des „dual compartment“- Proteins Raver1, wurde durch Datenbank-Analysen mit der Raver1-RRM-Region ein neues Protein identifiziert, das wegen seiner hohen Ähnlichkeit zu Raver1 „Raver2“ genannt wurde (Abbildung 9). Dabei handelt es sich um ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 72 kDa, welches in der Maus aus 625 AS besteht (Abbildung 9). Auf Grund der hohen Sequenzidentität innerhalb der RNP-Motive von Raver2 und Raver1 und einer prinzipiell gleichen Domänenstruktur wurde auf eine enge Verwandtschaft dieser beiden Proteine geschlossen (Kleinhenz et al., 2005). Auch Raver2 weist drei N-terminale RRM-Domänen auf und ist durch zwei NLS im N- und C-Terminus sowie eine zentrale, Leucin-reiche potentielle NES charakterisiert. Außerhalb der RRM's weist Raver2 jedoch keine signifikanten Homologien in der Primärsequenz zu Raver1 auf. Dennoch ist die Domänenstruktur beider Proteine ähnlich. Wie Raver1 ist auch Raver2 ein Bindungspartner von PTB (Kleinhenz et al., 2005).

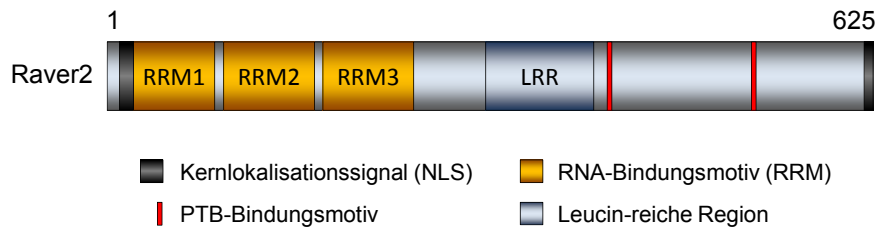


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Raver2-Proteins. Der strukturelle Aufbau des aus 625 Aminosäuren großen Raver2-Proteins ist ähnlich dem des Raver1 (Vergleich zu Abbildung 7). Es besitzt neben seinen drei N-terminalen RRMs (orange) je eine N- und C-terminale NLS (schwarz) sowie eine zentrale Leucin-reiche Region (hellgrau). Zwei rote, im C-terminalen Bereich des Proteins befindliche Balken, stellen potentielle Bindungsmotive des Raver2-Proteins für PTB dar, welche aus Sequenzanalysen identifiziert wurden (Diplomarbeit S. Becke, 2008).

Analog zu den vier identifizierten PTB-Bindungsmotiven des Raver1-Proteins, konnten im Raver2-Protein ebenfalls zwei solcher Motive identifiziert werden, die der Konsensus-Sequenz [S/G][I/L]LGxxP entsprechen (Diplomarbeit S. Becke, 2008). Die Assoziation von Raver2 mit PTB wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch Mutation der potentiellen Bindungsmotive negativ beeinträchtigt und überwiegend durch das so genannte SAAG-Motiv beeinflusst, dass sich C-terminal der Leucin-reichen Region befindet. Ein Einfluss auf die Spleißaktivität von PTB konnte bisher jedoch für Raver2 noch nicht nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit den NLS-Signalmotiven und einer potentiellen NES in der Leucin-reichen Region des Proteins ist auch Raver2 in der Lage, zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln, konnte bisher aber nur im Zellkern lokalisiert werden (Kleinhenz et al., 2005). Im Gegensatz zum ubiquitär exprimiertem Raver1 weist Raver2 außerdem ein deutlich eingeschränktes Expressionsmuster auf. Raver2 wird vor allem während der Embryogenese exprimiert, in der es vorrangig in neuronalen Strukturen auftritt. In adulten Mäusen ist die Expression von Raver2 auf wenige Gewebe wie Lunge, Gehirn und Niere beschränkt (Kleinhenz et al., 2005). Auch konnte für Raver2 bisher keine Interaktion mit den cytoplasmatischen Proteinen Vinculin und Meta-Vinculin nachgewiesen werden. Andererseits wurde in einem „Yeast Two-Hybrid-Screen“ einer embryonalen cDNA-Bank mit Raver2 als „Köder“ CELF4 als neuer Ligand für Raver2 identifiziert (Diplomarbeit N. Kieper, 2007). CELF4 ist ebenfalls ein RNA-bindendes Protein, das am Spleißen alternativer Exons beteiligt ist und für welches beim alternativen Spleißen des α -actinin-Gens eine antagonistische Funktion des Proteins zu PTB nachgewiesen werden konnte (Gromak et al., 2003b). Mit Raver1 scheint CELF4 jedoch nicht zu interagieren (Diplomarbeit S. Becke, 2008).

Eine völlige funktionelle Redundanz zwischen Raver1 und Raver2 scheint auf Grund der bisherigen Datenlage ausgeschlossen zu sein. Allerdings weisen beide Proteine gerade in ihrer

Bindung an PTB sowie der Ausbildung trimerer Komplexe als einzige (indirekte) Assoziation mit RNA deutliche Gemeinsamkeiten auf. Da Raver2 im Gegensatz zu Raver1 zudem in prokaryotischen Systemen exprimiert werden kann (Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005; Dissertation A. Zieseniss, 2005; Dissertation B. Henneberg, 2006), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gerade für die *in vitro* Analysen zu RNA-Bindung und PTB-Interaktion Raver2 vergleichend untersucht.

1.5 Ziel der Arbeit

Auf Grund seiner Primärstruktur wurde Raver1 den hnRNPs zugeordnet, da die drei im N-Terminus positionierten RRM-Domänen höchste Sequenzhomologien zu Vertretern dieser Proteinfamilie aufweisen. Eine direkte Assoziation mit RNA konnte für Raver1 bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden und wurde lediglich indirekt über eine Rekrutierung durch den Spleißfaktor PTB beschrieben (Dissertation B. Henneberg, 2006; Rideau et al., 2006). In Assoziation mit PTB wurde Raver1 basierend auf Minigen-Analysen in transfizierten Zelllinien die Funktion eines Co-Repressors zugeschrieben. Eine entsprechende Analyse endogener Spleißvorgänge wurde jedoch nicht durchgeführt, so dass die zelluläre Bedeutung von Raver1 weiterhin spekulativ bleibt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung von Raver1 als hnRNP in Bezug auf seine Assoziation mit RNA, die Bindung an den Spleißfaktor PTB sowie eine mögliche Beeinflussung PTB-vermittelter Spleißprozesse *in vivo*. Zunächst sollte hierfür die Assoziation von Raver1 mit RNA *in vitro* weiterführend analysiert werden. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen sollten dabei insbesondere die isolierten RRM-Domänen auf eine direkte Bindung an RNA untersucht werden. Darüber hinaus sollte auch die Wechselwirkung von Raver1 mit PTB dahingehend charakterisiert werden, inwieweit die potentiellen PTB-Bindungsmotive tatsächlich für eine Interaktion mit PTB von Bedeutung sind. Alle diese Untersuchungen sollten vergleichend an Raver2 durchgeführt werden. Zum einen, weil eine bakterielle Expression von Raver2, nicht aber Raver1 möglich ist, zum anderen, weil gerade die RRM-Domänen beider Raver-Proteine hohe Sequenzhomologien aufweisen und auch ihre Bindung an PTB wahrscheinlich über entsprechende Peptidmotive erfolgt.

Schließlich sollte der modulative Einfluss von Raver1 auf PTB-vermittelte Spleißprozesse *in vivo* durch vergleichende Untersuchungen an Wildtyp und Raver1-defizienten Mäusen analysiert werden. Mittels quantitativer „real time“-PCR (qPCR) sollten sechs publizierte PTB-Zielgene auf eine mögliche Verschiebung in ihrer Prozessierung durch alternatives

Spleißen untersucht werden. Der Schwerpunkt lag hierbei darauf, relative Veränderungen in den einzelnen Spleißvarianten darzustellen und diese Verschiebungen in Bezug auf eine mögliche Co-Repressor-Funktion von Raver1 hin zu überprüfen. Die Untersuchungen des Mausmodells sollten durch zelluläre Analysen komplementiert werden, in denen sowohl die Expression von PTB als auch Raver1 durch RNA-Interferenz moduliert werden sollte. Die Kombination dieser Methoden sollte ermöglichen, eventuelle Spleißverschiebungen im Organismus kausal mit einer Beeinflussung der PTB-Spleißaktivität zu korrelieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

CCD-Kamera:	Micromax, Princeton Instruments Inc., Trenton, USA
ELISA-Reader:	MRX, Dynatech Lab., Denkendorf
Geldokumentationsanlage:	Herolab GmbH, Wiesloch
Heizblock:	DRI-Block DB-2A, Techne, Burlington, USA
Heizschüttler:	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
Homogenisator:	Ultra Turrax T24 IKA Labortechnik, Staufen Ultra Turrax T25 Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Inkubatoren:	Jouan EB280, Fernwald Steri-Cult200, Forma Scientific, Ohio, USA
Mikroskope:	Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Zeiss, Göttingen Invertmikroskop Telafal 31 , Zeiss, Göttingen
Minigelkammer:	Xcell Sure Lock, Invitrogen, Karlsruhe Comphor Mt Maxi, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
qPCR-Cycler:	DNA Engine Opticon® 2, MJ Research, Waterton, USA
PCR-Cycler:	MJ Research PTC-200, GMI, Ramsey, USA
Spektralphotometer:	Ultrospec 2100 Pro Amersham Pharmacia Biotech, Wien
Semi-Dry-Blot:	FastBlot 44B, Biometra, Göttingen
Sequencer:	Abiprism™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Weiterstedt
Software:	Metamorph Systems, Adobe Photoshop CS2, Microsoft Office 2007, Lasergene DNASTar, OpticonMonitor® V2.02,
Ultraschallgerät:	Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA
UV-Leuchttisch:	E.A.S.Y. RH, Herolab GmbH, Wiesbaden
Vortex Genie™2:	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge J2-MC, Beckman, Krefeld Kühlzentrifuge 3K15, Sigma, Osterode am Harz Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau Tischzentrifuge 113, Sigma, Osterode am Harz

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich (Steinheim), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Mobitec (Göttingen) Applichem (Darmstadt und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Enzyme stammen, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), PAA Laboratories (Cölbe) und Promega (Mannheim).

Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q/UF-System (Millipore, Eschborn) aufbereitet wurde. Sterilisiert wurde durch Autoklavieren oder Sterilfiltration.

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden die *Escherichia coli*-Stämme XL1-blue, M15, BL21(DE3) und ER2566 eingesetzt. Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

XL-1 blue	supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi rel A1 lac ⁻ F' [pro AB ⁺ lacI ^q LacZΔM15 Tn10(tet ^r)] (Bullock et al., 1987)
M15	Nal ^S , Str ^S , Rif ^C , Thi ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ (Villarejo & Zabin, 1974)
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _b ⁻ m _B ⁻), gal, dcm, met (DE3), pLysS(Cam ^R) (Studier & Moffat, 1986)
ER2566	[fhuA2 (lon) ompT lacZ::T7 gene1 galsulA11 D(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10-TetS) endA1(dcm)] (New England Biolabs)

2.1.4 Zelllinien

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden die folgenden tierischen Zelllinien verwendet.

C2C12	ATCC-Nr. CRL-1772; murine Myoblastenzelllinie (Yaffe & Saxel, 1977)
HeLaX15	ECACC-Nr. 95051229; humane Cervix-Karzinomzelllinie (Gossen & Bujard, 1992)
HEK-293T	ATCC-Nr. CRL-1573; humane, embryonale Nierenzelllinie (Graham & Smiley, 1977)
MEF	murine, embryonale Fibroblastenzelllinie (Dissertation. B. Henneberg, 2006)
MEFR1-KO	murine, embryonale Fibroblastenzelllinie ; Raver1 defizient. In der vorliegenden Arbeit wurden die Klone Hom1 und Hom3 verwendet (Dissertation. B. Henneberg, 2006).

2.1.5 Vektoren

Die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* erfolgte mit dem Vektor pQE30 (Qiagen). Dieser Vektor besitzt neben der Ampicillin-Resistenz einen durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) induzierbaren T5-Promotor, der die Expression des inserierten DNA-Fragmentes als Fusionsprotein mit sechs N-terminalen Histidinen bewirkt. Über diesen His-„tag“ können die Fusionsproteine affinitätschromatographisch mittels einer Nickel-NTA-Matrix (Nickel-Nitriloessigsäure, Qiagen) aufgereinigt werden. Zur Kontrolle der Expressionsrate kann zusätzlich der pRep4-Vektor (Invitrogen), welcher eine Kanamycin-Resistenz besitzt, eingesetzt werden.

Weiterhin wurde für die Expression rekombinanter Proteine der Vektor pGex4T-1 (Amersham) und ein modifizierter pet21C-Vektor (Novagen) eingesetzt, welcher die Bezeichnung pet21C-GST hat (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. S. Illenberger) und in den über die Restriktionsschnittstellen Sal I/Xho I ein GST-Fusionsanteil inseriert wurde. Im 5'-Bereich konnten damit Konstrukte ohne Stoppcodon über

EcoR 1/Xho 1 im Leseraster kloniert werden. In beiden Fällen lässt sich die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG induzieren. Es entsteht dabei ein Fusionsprotein, das am N-Terminus (pGex4T-1) oder C-Terminus (pet21C-GST) einen GST-Fusionsanteil trägt. Dies ermöglicht die Aufreinigung der entsprechenden Proteine über Glutathion-Sepharose-Beads 4 Fast Flow (Amersham). Im Gegensatz zum T7-Promotor des pet21C-GST-Vektors, besitzt der pGex4T-1-Vektor einen tac-Promotor.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Proteinen in kultivierten eukaryotischen Zellen kamen insbesondere die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-C2 (Clontech) zum Einsatz. Beide Vektoren beinhalten am 5'-Ende der MCS („multiple cloning site“) die Sequenz für das so genannte EGFP („enhanced green fluorescent protein“). Nach dem Einbringen der Vektor-DNA in Zellen entsteht so ein Fusionsprotein, das N-terminal einen GFP-Fusionsanteil trägt. Dieser fluoresziert bei Anregung mit blauem Licht ($\lambda=440$ nm) grün und ermöglicht so die Untersuchung der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins ohne den Einsatz spezifischer Antikörper.

Sollte ein Protein in kultivierten Zellen auf Lokalisation untersucht oder mittels „TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Kit“ (Promega, Mannheim) *in vitro* transkribiert und translatiert werden, wurde der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 verwendet. Zur Vereinfachung der Handhabung der zu untersuchenden Proteine wurde der Vektor zusätzlich mit einem Fusionsanteil („tag“) versehen. Dabei handelt es sich um kurze Nukleotidsequenzen, die im Leseraster vor die MCS des Vektors über Ligation eingebracht wurden. Diese kodieren für kurze Aminosäuresequenzen, die nach Einbringen des Vektors in die Zelle als N-terminaler Fusionsanteil des Proteins vorliegen und mit vorhandenen, spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Verwendet wurde zum einen der so genannte BiPro-Epitop-„tag“, der aus einer kurzen Aminosäuresequenz des Proteins Profilin aus der Birke besteht. Dieser kann durch einen entsprechenden monoklonalen Antikörper (4A6, Rüdiger et al., 1997; Wiedemann et al., 1996) spezifisch nachgewiesen werden. Andererseits kam der so genannte FLAG-Epitop-„tag“ zum Einsatz (Slootstra et al., 1997), der durch einen spezifischen FLAG-Antikörper (M2, Sigma Aldrich) nachgewiesen werden kann (siehe Kapitel 2.1.8). Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pGEM[®] T-easy (Promega) verwendet. Der Vektor besitzt zwei 3'-T-Überhänge zwischen die PCR-Produkte inseriert werden konnten, insofern sie mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Die MCS wird von einem SP6- und einem T7-Promotor flankiert. Die MCS befindet sich in der α -Peptide codierenden Sequenz des Enzyms β -Galaktosidase, wodurch die Vektoren für eine Blau-Weiß-Selektion verwendet werden konnten (siehe Kapitel 2.3.3).

2.1.6 Minigene

Beide in dieser Arbeit verwendeten Minigene (Izquierdo et al., 2005) wurden freundlicherweise von Prof. Juan Valcarcel (Barcelona, Spanien) zur Verfügung gestellt.

Fas-wt

Das Fas-wt-Minigen beinhaltet die genomische Sequenz zwischen Exon5 und Exon7 des humanen Fas Gens. Dieses Konstrukt wurde mit einem N-terminalen FLAG-Epitop-„tag“ in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert.

Fas U-20C

Das Fas-Minigen U-20C umfasst ebenfalls die Exons 5, 6 und 7. Hierbei wurde eine Substitution von Uridin zu Cytidin an der Position -20nt der 3'-Spleißstelle des Intron5 vorgenommen. Diese Mutation führt zu einer geringeren Integrierung des Exon6 in die mRNA des Minigens in HeLa-Zellen (Izquierdo et al., 2005)

2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide befinden sich im Anhang (Kapitel 5.4). Die zur Klonierung und Sequenzierung von Konstrukten verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgelistet. Primer die zur Amplifikation in „real-time“-PCR-Analysen verwendet wurden, sind in Tabelle 7 dargestellt. Die zum „knock down“ von Raver1 und PTB1 verwendeten Duplices sind in Tabelle 8 erfasst.

2.1.8 Antikörper

In Tabelle 1 und Tabelle 2 sind die für die Arbeit verwendeten Erst- und Zweitantikörper, sowie sonstige verwendete Agenzien zuzüglich ihrer Verdünnungen in den verwendeten Methoden aufgelistet.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper

Bezeichnung laut Hersteller	Antigen	Quelle	Organismus	Art	Verdünnung
α -FLAG (M2)	FLAG-Epitop- „tag“	Sigma Aldrich	Maus	monoklonal	1:10000 (WB) 1:1000 (IF)
α -BiPro (4A6)	BiPro-Epitop- „tag“	EH	Maus	monoklonal	1:50(WB) 1:10 (IF)
α -GST (G1417)	GST-Epitop- „tag“	Sigma Aldrich	Kaninchen	monoklonal	1:500 (WB)
4C8	Raver2	EH	Maus	monoklonal	unverdünnt (WB)
9D5	Raver2	EH	Maus	monoklonal	1:3 (WB) 1:10 (IF)
5G6	Raver1	EH	Maus	monoklonal	1:5 (WB) 1:10 (IF)
3A6	Raver1	EH	Maus	monoklonal	1:100 (WB)
7D3	Raver1	EH	Maus	monoklonal	1:2 (WB) 1:10 (IF)
BB7	PTB	C. S.	Maus	monoklonal	1:2 (WB) 1:10 (IF)
4E11	PTB	EH	Maus	monoklonal	1:3 (WB) 1:10 (IF)
BM439	GAPDH	Acris	Maus	Monoklonal	1:8000 (WB)

EH: Eigene Herstellung (Sabine Buchmeier, AG Zellbiologie); C.S.: C.W. Smith, Cambridge;
WB: Western-Blot; IF: Immunfluoreszenz

Tabelle 2: Zusammenfassung aller eingesetzten Zweitantikörper und anderer verwendeter Agenzien

Bezeichnung laut Hersteller	Antigen	Quelle	Organismus	Verdünnung
α -mouse-IgG-HRP	Maus IgG	Sigma Aldrich	Kaninchen	1:2000 (WB)
α -rabbit-IgG-HRP	Kaninchen IgG	Sigma Aldrich	Ziege	1:10000 (WB)
anti-Maus-IgG-FITC	Maus IgG	Sigma Aldrich	Ziege	1:50 IF
anti-Maus-IgG-TRITC	Maus IgG	Sigma Aldrich	Ziege	1:100 IF
α -rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:250 (IF)
α -mouse IgG-Alexa Fluor 459	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:300 (IF)
DAPI		Appllichem		1.1000

WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien

Zur Anzucht von *E.coli* Bakterien wurden Einzelkolonien in 3 ml 2YT-Medium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) bzw. LB-Medium (Luria Bertani; 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) über Nacht (ü.N.) bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Größere Schüttelkulturen wurden im Verhältnis 1:50 bis 1:100 angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das jeweilige Medium mit 15-20 g/l Agar versetzt, worauf die Bakterien in einem Volumen von 100-200 µl ausplattiert werden konnten. Wie die Flüssigkulturen wurden auch die Agarplatten ü.N. bei 37°C inkubiert und konnten anschließend bei 4°C gelagert werden. Zur Selektion rekombinanter Klone wurde dem Medium in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor Kanamycin (50 µg/ml) bzw. Ampicillin (150 µg/µl) zugesetzt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um die verschiedenen *E.coli* Stämme zur Aufnahme von DNA zu befähigen, wurden zunächst mit Hilfe einer Impföse die Bakterien auf einer 2YT-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten ü.N. im Inkubator bei 37°C inkubiert. Aus einer 3 ml ü.N. Flüssigkultur dieser Platten wurden 100 µl 2YT-Medium ohne Antibiotika angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 wachsen gelassen. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension für 5 min bei 6000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 10 ml TFB1-Puffer (0,3 M Natriumacetat pH 5,8, 50 mM MnCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin) resuspendiert und nach weiterer Zugabe von 90 µl TFB1-Puffer 10 min auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation (5 min, 6000 rpm, 4°C) an. Danach wurden die sedimentierten Bakterien in 13 µl TFB2-Puffer (100 mM MOPS pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM NaCl, 15% Glycerin) aufgenommen, resuspendiert und schließlich in gewünschte Volumina aliquotiert. Nachdem die Bakterien in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, konnten sie bei -70°C gelagert werden.

2.3.2 Transformation

Die Transformation der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte nach dem Verfahren von Hanahan (1983). 200 μ l kompetente Bakterienzellen wurden bei 4°C auf Eis aufgetaut. 10 μ l des Ligationsansatzes bzw. 1 μ g Plasmid-DNA wurden zu den kompetenten Bakterien gegeben, kurz geschüttelt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei 42°C im Heizschüttler. Anschließend wurden die Bakterien erneut für 5 min auf Eis gestellt. Zu der Bakteriensuspension wurden 500 μ l 2YT-Medium ohne Antibiotika gegeben und für 30 min (Ampicillin) bzw. 45 min (Kanamyzin) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Transformationen von Ligationsansätzen wurde das gesamte Volumen, bei Re-Transformationen 100 μ l der Bakterien auf 2YT-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Selektion transformierter *E. coli*-Bakterien

Die Auswahl von transformierten Bakterien erfolgte mittels Blau-Weiß-Selektion. Dabei produzieren die eingesetzten Bakterien eine inaktive β -Galaktosidase, die durch α -Komplementation aktiviert wird. Das für die Komplementation notwendige Protein wird auf dem Plasmid kodiert, welches in die Bakterienzellen transformiert wird. Durch den Einbau eines DNA-Fragments (=„Insert“) in die MCS des Plasmid wird die kodierende Sequenz unterbrochen und die Bildung des für die Komplementation notwendigen Proteins unterbleibt. Damit kann keine β -Galaktosidase in den Bakterien synthetisiert werden. Da die β -Galaktosidase das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff hydrolysiert, lassen weiße Kolonien auf ein Plasmid mit Insert schließen, wohingegen negative Klone blau gefärbt sind. Zur Isolation von positiven Klonen wurden die Bakterien nach der Transformation auf 2YT-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen, die mit 100 μ l 0,1 M IPTG und 40 μ l X-Gal beschichtet waren.

2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation der transformierten Plasmide erfolgte nach der klassischen Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Bei der ersten Zentrifugation werden die Zellen sedimentiert, deren Membran anschließend durch Zugabe von NaOH für Detergenzien und Chelatoren wie SDS („sodium dodecyle sulfate“) und EDTA permeabel gemacht wird. NaOH denaturiert Proteine und zerstört so die Zellmembran, die dann permeabel für Ionen und Detergenzien wird. Gleichzeitig denaturiert NaOH die genomische DNA und die Proteine aufgrund des alkalischen pH-Wertes. Das SDS dringt in die Zellen ein und solvatisiert Proteine und DNA, indem es sich an diese anlagert und die Proteine sowie die genomische DNA denaturiert werden. Die Plasmid-DNA wird von NaOH und dem Detergenz kaum beeinflusst, da sie in der ‘supercoiled’ Form vorliegt und sich NaOH nicht anlagern kann. Durch Behandlung mit Kalium-Acetat fallen die Proteine, genomische DNA und Zelltrümmer aufgrund von Salzbildung und Überschreitung des Löslichkeitsproduktes aus und sedimentieren während der Zentrifugation. Aus dem plasmidhaltigen Überstand kann die gelöste Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt, und verbleibende Salze durch Waschen mit 70%-igem Ethanol entfernt werden.

2.3.4.1 Mini-Plasmidpräparation

Nach dem Zentrifugieren einer 3 ml ü.N. Kultur bei 6500 rpm für 5 min wurde das erhaltene Bakterienpellet in 300 µl P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert und die Suspension mit 300 µl P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt und invertiert. Auf eine Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 300 µl P3 (3 M K-Acetat, pH 5,5). Danach wurde die Bakteriensuspension zweimal für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 630 µl Isopropanol und kurzem Vortexen wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm präzipitiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 300 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, anschließend kurz getrocknet und in 50 µl MQ-H₂O oder 10 mM TRIS/HCl-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge durchgeführt.

2.3.4.2 Midi-Plasmidpräparation

Um große DNA-Mengen hoher Reinheit für die Transfektion eukaryotischer Zellen zu erhalten, wurde eine alkalische Lyse mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Die Präparation erfolgte mit dem „Plasmid Midi Purification Kit“ nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Die isolierte DNA wurde in 50-200 µl 20 mM Tris pH 7,4 aufgenommen.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und der Grad der Verunreinigung durch Proteine wurden spektrophotometrisch durchgeführt.

Dabei wurde die Absorption der DNA-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml bei einer Schichtdicke von 1 cm. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption von Tyrosin und Tryptophan) bestimmt. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch Verunreinigungen mit Proteinen wird dieser Quotient zu kleineren Werten verschoben.

2.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen sind natürlicherweise in Bakterien vorkommende DNasen, die dem Abbau von Fremd-DNA dienen. Restriktionsendonucleasen binden spezifisch an zumeist palindromartig angeordnete DNA-Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiesterbindungen. Bei dieser Hydrolyse entstehen in Abhängigkeit vom verwendeten Enzym entweder „sticky ends“ (5'- oder 3'-Überhänge) oder „blunt ends“ (glatte Enden). Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 0,5-2 µg DNA verwendet. Bei präparativen Anwendungen wurden 2-5 µg DNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl mit 0,1-1 U Enzym/µg DNA (1 Unit Enzym spaltet 1 µg DNA/h).

Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (NEB) mit den jeweils empfohlenen 10x Puffern.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten nutzt man ihre durch Phosphatgruppen hervorgerufene negative Ladung. Im elektrischen Feld bewegen sich die negativ geladenen DNA- und RNA-Moleküle in der Matrix des Gels mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zur Anode. Je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente wurden 0,8-3%-ige Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris/HCL pH 8,0, 45 mM Borsäure, 2 mM EDTA) eingesetzt. Pro Gel wurden 3 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung verwendet. Die aufgetragenen DNA-Proben wurden mit 5x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) versetzt und in die Taschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente mittels des interkalierenden, fluoreszierenden Ethidiumbromids detektiert.

Als DNA-Größenmarker wurden GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331 (Fermentas, St.Leon-Rot), Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker#SM0191 (Fermentas) sowie HyperLadder V (Bioline, Luckenwalde) verwendet.

2.3.8 DNA-Fragmentisolierung

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach der Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und im Anschluss mit Hilfe des „QIAEX® II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die negativ geladene DNA wird dabei an Glasmilch (QIAEX® II Suspension) gebunden und anschließend entsprechend der Herstellerangaben eluiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück zunächst im Thermoinkubator bei 50°C mit 500 µl QX1-Lösung und 15 µl Glasmilch für 15 min unter Schütteln gelöst. Der Ansatz wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend erneut mit 500 µl QX1-Lösung gewaschen. Nachdem der Waschschrift ein zweites Mal wiederholt wurde, konnte das Pellet zweimal mit 500 µl PE-Lösung gewaschen werden.

Daraufhin wurde das Pellet 5 min bei 70°C getrocknet und in 25-50 µl MQ-H₂O resuspendiert. Durch eine erneute Inkubation der Lösung für 15 min bei 50°C löste sich die DNA von der Glasmilch, die durch Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm sedimentierte. Die im Überstand befindliche DNA konnte nun in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden.

2.3.9 Ligation

Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen DNA-Fragmenten katalysiert. Als Co-Faktor zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe benötigt die hier verwendete T4-Ligase (New England Biolabs) ATP, welches in den entsprechenden Puffern enthalten ist. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt (Insert und 0,1-0,5 µg Vektor in einem Verhältnis von etwa 3:1, 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 1 U T4 DNA-Ligase). Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 16°C oder 1 h bei RT. Der Ligationsansatz wurde im Anschluss direkt in *E.coli* transformiert.

2.3.10 Hybridisierung von Oligodesoxynukleotiden zur Herstellung von Sequenzmarkern („tags“)

Für die Herstellung der Sequenzmarker aus Oligodesoxynukleotiden wurden die entsprechenden komplementären Oligodesoxynukleotide miteinander hybridisiert. Je 5 µl „sense“ und „reverse“ Oligodesoxynukleotid mit einer Konzentration von je 100 pmol/µl wurden mit 90 µl H₂O gemischt, 2 min bei 95°C inkubiert und zur Hybridisierung langsam auf 4°C abgekühlt. In der Regel wurden die Oligodesoxynukleotide so synthetisiert, dass die Hybride an den Enden überstehende Einzelstrangsequenzen tragen, die in ihrer Sequenz den Überhängen entsprechen, die nach Restriktion mit spezifischen für die Klonierung verwendeten Endonukleasen entstanden wären. Die so hergestellten „Linker“ wurden direkt in der Ligation eingesetzt. Dieses Verfahren wurde für die simultane Klonierung kurzer 5'-gelegener „tags“ mit den gewünschten cDNA-Fragmenten in Expressionsvektoren verwendet und dient dazu, die Detektion der zu untersuchenden Proteine zu erleichtern. Die verwendeten „tags“ waren zum einen der so genannte BiPro-„tag“, der aus einer kurzen Aminosäuresequenz des Proteins Profilin aus der Birke besteht. Dieser kann durch einen

entsprechenden monoklonalen Antikörper (4A6; Wiedemann et al., 1996, Rüdiger et al., 1997) spezifisch nachgewiesen werden. Andererseits kam der so genannte FLAG-Epitop-„tag“ zum Einsatz (Slootstra et al., 1997), gegen den Antikörper käuflich zu erwerben sind (M2, Sigma Aldrich).

2.3.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird eine exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch zyklische Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung („Annealing“) und DNA-Synthese erreicht. Für analytische Zwecke, wurde die rekombinante Taq-DNA-Polymerase (Takara, Göttingen) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt, die über keine 3'→ 5'-Exonukleaseaktivität verfügt und entsprechend eine erhöhte Fehlerrate während der Synthese aufweist. Wurde auf eine geringere Fehlerrate für weitere Klonierungen Wert gelegt, erfolgte die Amplifikation mit der Tli-DNA-Polymerase (Promega), die eine 3'→ 5'-Exonukleaseaktivität aufweist. Die Qualität der PCR wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die entsprechende Bande mittels Fragment-Isolierung präpariert. PCR-Ansätze zur präparativen sowie zur analytischen Amplifikation von DNA wurden nach folgenden Protokollen zusammengestellt:

präparative PCR:

25–50 ng „template“-DNA
 5 µl 10 x Tli-Puffer
 5 µl 10 x MgCl₂ (25 mM)
 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM)
 1,5 µl Primer1 (10 pmol/µl)
 1,5 µl Primer2 (10 pmol/µl)
 0,5 µl Tli-Polymerase (5 U/µl).
 Summe: = 50 µl (mit H₂O aufgefüllt.)

analytische PCR:

0,3 µg cDNA
 2,0 µl dNTP-Mix (2,5 mM)
 2,5 µl Taq-Puffer
 0,25 µl Primer1 (100 pmol/µl)
 0,25 µl Primer2 (100 pmol/µl)
 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 Summe: = 25 µl (mit H₂O aufgefüllt.)

2.3.12 Sequenzierung

Die nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA basiert auf einem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger, 1977). Die hier eingesetzte Methode bedient sich der AmpliTaq[®]-Polymerase FS (PE AppliedBiosystems, Weiterstadt) und wird als „Cycle-Sequencing“ bezeichnet. Hierbei werden zusätzlich zu den Desoxynukleotiden Didesoxynukleotide eingesetzt, die aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe keine weiteren Phosphodiesterbindungen ausbilden können und somit zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide können die DNA-Moleküle mit Hilfe des ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer (PE AppliedBiosystems) mittels Laser detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgt automatisch über die zugehörige Software. Für die PCR-Sequenzreaktion wurden 2 µl Premix, 1 µl Primer (5 pmol/µl) und 0,25-0,5 µg dsDNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide zu entfernen, wurde der PCR Ansatz mit 2 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 55 µl 100% reinem Ethanol versetzt und anschließend 30 min bei 13000 rpm präzipitiert. Das Sediment wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Der getrocknete Ansatz wurde in 13 µl Hi-Di[™]-Formamid (PE Applied Biosystems, Darmstadt) aufgenommen und 2 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit dem ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer nach Herstellerangaben.

2.3.13 Präparation verschiedener Gewebe aus Maus

Alle Experimente wurden entsprechend der Richtlinien des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, durchgeführt (T0407/98). Jeweils zu Versuchsbeginn wurde die Maus mittels Äther tief narkotisiert und anschließend per zervikale Dislokation getötet. Nach der Präparation wurden die Organe in eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und im mechanischen Homogenisator zerkleinert. Zuvor wurden die Proben je nach Größe des Organs mit 1-4 ml RNAPure[™] (Peqlab, Erlangen) überschichtet, wenn eine RNA-Isolation daraus erfolgen sollte. Für die Herstellung von Gewebeextrakten wurde das entsprechende Organ mit 1-4ml SDS-Lysispuffer (5 mM Tris/HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 5 mM KCl, 0,2%

SDS und Proteaseinhibitoren 1:500) überschichtet. Das homogenisierte Gewebe konnte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

2.3.14 RNA Isolation aus Gewebe (embryonal/adult)

Um unerwünschte Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden grundsätzlich Handschuhe getragen sowie RNase/DNase-freie Pipettenspitzen (Pipetlab, Erlangen) und Reaktionsgefäße für die Isolierung von RNA verwendet. Nachdem die Gewebe in RNAPure™ mittels mechanischer Hilfe homogenisiert wurden, diente eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur der Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Der Überstand der Suspension wurde nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und 4°C in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Pro ml überführtem Überstand wurden 200 µl kaltes Chloroform hinzugeben, 15 sec gevortext und die Proben 10 min auf Eis inkubiert. Ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12000 g und 4°C führt zur Ausbildung von drei Phasen. Die obere wässrige Phase welche die RNA-Moleküle enthält, wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu je 1 ml überführtem Überstand wurden 500 µl Isopropanol gegeben, mehrmals invertiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 12000 g und 4°C. Die präzipitierte RNA konnte nun mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet werden. Je nach Pelletgröße wurde die RNA in 50-200 µl Wasser aufgenommen und photometrisch vermessen. Die RNA-Proben konnten für einige Monate bei -70 °C gelagert werden.

2.3.15 RNA Isolation aus Zelllinien

Die geernteten Zellen wurden in 1 ml peqGOLD TriFast™ (Pipetlab) aufgenommen und resuspendiert. Zur Dissoziation der Nukleinsäurekomplexe erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei RT. Nach anschließender Zentrifugation zur Phasentrennung für 10 min bei 12000 g und 4°C, konnte die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Zum Fällern der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol je eingesetztem ml peqGOLD TriFast™ hinzu gegeben und die Probe nach Invertieren für 5-15 min bei 4°C inkubiert. Um die ausgefällte RNA zu pelletieren, wurde die Probe für 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Das RNA Pellet konnte anschließend 2x mit je 1 ml 75%-igem Ethanol

durch Vortexen und Zentrifugation (10 min, 12.000 g, 4°C) gewaschen werden. Nachdem das RNA-Pellet nahezu vollständig an der Luft getrocknet wurde, konnte es in sterilem H₂O gelöst werden. Die RNA-Proben konnten für einige Monate bei –70 °C gelagert werden.

2.3.16 Qualitätsbestimmung von RNA

Die Qualität der jeweils isolierten RNA wurde in einem 1%-igen Agarosegel überprüft. Dazu wurden 4 µg RNA mit 5 µl 5x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Eine gute Qualität der RNA zeichnete sich durch zwei charakteristisch scharfe 28S- und 18S-rRNA Banden ab. Lagen diese beiden Banden in etwa in einem Verhältnis von 2:1 vor, wurde die Qualität dieser Präparation für weitere Analysen als geeignet beurteilt. Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt. Der Koeffizient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1,8 und 2 liegen, um größere Verunreinigungen mit Proteinen und aromatischen Substanzen ausschließen zu können. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Berechnung ermittelt:

RNA [ng/µl] = Extinktion_{260nm} x Verdünnung x 40.

2.3.17 Synthese der cDNA durch Reverse Transkriptase

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase („Moloney Murine Leukemia Virus“ = M-MLV, Promega) wurde aus der RNA-Matrize eine DNA-Kette synthetisiert. Hierzu wurden 4 µg der isolierten Gesamt-RNA zum „Pre-Annealing“ mit 2 µl Random Hexamer- bzw. Oligo(dt)₁₅-Primer (Promega) in einem Gesamtvolumen von 29 µl für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach einer anschließenden 10-minütigen Inkubation der Probe bei 4°C konnte folgender Mastermix hinzu gegeben werden:

8 µl M-MLV-Puffer
2 µl dNTPs (TaKaRa)
0,5 µl RNasin Plus
0,5 µl M-MLV

Danach erfolgte die reverse Transkription der Proben für 70 min bei 37 °C und die Reaktion konnte anschließend für 5 min bei 95 °C abgestoppt werden.

2.3.18 Generierung von Primern

Die für die Arbeit verwendeten Primer für qPCR-Analysen wurden mit Hilfe des Programms Primer Select (DNASar, Madison, USA) erstellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die generierten Oligodesoxynukleotide eine Schmelztemperatur von etwa 65°C, einen GC-Gehalt von ca. 50% und eine Länge des Amplifikat zwischen 150 nt und 300 nt hatten. Die Tendenz der Primer Dimere und Hairpin-Strukturen auszubilden, sollte möglichst gering gehalten werden. Die Primer wurden anschließend mittels Gradienten-PCR auf ihre Spezifität überprüft, wobei ein Temperatur-Gradient von 55°C bis 65°C verwendet wurde. Weitere für die Klonierung von Konstrukten bestimmte Oligodesoxynukleotide wurden von der Operon Biotechnologies GmbH (Köln) bezogen. Alle verwendeten Primer sind im Anhang in den Tabellen 7, 8 und 9 aufgelistet.

2.3.19 Quantitative „real time“- PCR

Bei der quantitativen „real time“-PCR (qPCR) wird dem PCR-Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt. Dieser Farbstoff besitzt DNA-bindende Eigenschaften. Er heftet sich bei der PCR-Amplifikation an entstehende Doppelstrang-DNA und sendet nach Anregung ein Fluoreszenzsignal bestimmter Wellenlänge (494 und 521 nm) aus. Somit lässt sich bei jedem Temperaturzyklus der PCR der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen (daher „Echtzeit“-PCR; Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Abweichungen in der Fragmentlänge oder Primer-Dimere lassen sich mittels Schmelzkurvenanalyse differenzieren (OpticonMonitor® V2.02, MJ Research, Waterton, USA). Die Gentranskripte konnten in ihrer relativen Menge zueinander sowie quantitativ in den verschiedenen Zelllinien und Geweben bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Reaktionsmix 2x PCR Mix verwendet (Qiagen). Die Reaktion fand in einem DNA Engine Opticon® 2 Gerät (MJ Research) statt. In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung der Ergebnisse vorgenommen, wodurch als interne Kontrollen Primer verwendet wurden, die so genannte „House-Keeping“ Gene amplifizieren. In diesem Fall waren es die Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), „Ribosomal protein, large, P0“ (RPLP0) und Cyclophilin. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

7,5 µl	2xPCR-Mix
0,3 µl	SYBR-Green
0,4 µl	cDNA
0,2 µl	Primer1 (100 pmol/µl)
0,2 µl	Primer2 (100 pmol/µl)
6,4 µl	Wasser

Der Reaktionsansatz (je 15 µl) wurde in Hard-Shell™ 96-well Microtiterplatten (MJ Research) gegeben und mit Microseal B Adhesive Seal (MJ Research) verschlossen. Die PCR-Reaktion im Gerät lief unter folgenden Bedingungen ab:

10 min	95°C
20 sec	94°C
30 sec	60°C
30 sec	72°C

Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte zwischen 65°C und 95°C.

Gemessen wurde jeweils der Zyklus-Wert, in dem alle zu untersuchenden Proben den sogenannten Schwellwert (= Threshold-Wert) durchlaufen. Dieser Wert wurde manuell an den Anfang der exponentiellen Phase der PCR gelegt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Berechnung der ΔC_T -Methode (Pfaffl, 2001).

1. $\Delta C_T = 100 * (2^{-(\text{Zielgen}_{\text{„knock out“}} - \text{HK}_1)} - (\text{Zielgen}_{\text{Wildtyp}} - \text{HK}_1))$
2. $\Delta C_T = 100 * (2^{-(\text{Zielgen}_{\text{„knock out“}} - \text{HK}_2)} - (\text{Zielgen}_{\text{Wildtyp}} - \text{HK}_2))$

Da in dieser Arbeit eine Kreuznormalisierung zu zwei „house keeping“-Genen (HK-Gen) vorgenommen wurde, konnte der Mittelwert aus beiden oben aufgeführten Formeln gebildet werden.

Die Signifikanzen in den Spleiß-Analysen wurden durch den Student'schen T-Test mit Hilfe des Programms Microsoft Excel® (Redmond, USA) ermittelt. Dabei wurde der Datensatz der qPCRs (Matrix1) mit dem Idealwert 100 (Optimalwert einer Nicht-Verschiebung, Matrix2) in einem einseitigen Test (Verwendung einer Endfläche) mit ungleicher Varianz beider Stichproben (heteroskedastisch) analysiert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Gelelektrophorese

2.4.1.1 Herstellung der Gele

Die mit Ethanol gesäuberten Glasplatten wurden in einem Gelblock zusammengebaut, woraufhin das Trenngel in den durch die Abstandhalter geschaffenen Spalt gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach dem Auspolymerisieren des Acrylamids wurde das Isopropanol dekantiert und der Block mit Wasser gewaschen. Das Sammelgel konnte anschließend gegossen und der Kamm eingesetzt werden. Die jeweilige Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel ist in Tabelle 3 und Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Trenngels

Komponente	7,5%	10%	13,5%
Acrylamidlösung: (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	7,5 ml	10 ml	13,5 ml
Trenngelpuffer: (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
H ₂ O	14,8 ml	12,4 ml	8,9 ml
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyldiamin)	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml
APS (10 % Ammoniumpersulfatlösung in H ₂ O)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	7,5%-12,5%
Acrylamidlösung: (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	13,5 ml
Trenngelpuffer: (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)	7,5 ml
H ₂ O	8,9 ml
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyldiamin)	0,01 ml
APS (10 % Ammoniumpersulfatlösung in H ₂ O)	0,2 ml

2.4.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden die zuvor hergestellten Polyacrylamid-Gele verwendet. Durch Zugabe von SDS, einem anionischen Detergenz, welches an hydrophobe Aminosäuren bindet, werden die zu trennenden Proteine negativ maskiert. Die Eigenladung kann somit vernachlässigt werden und die Proteine wandern, auf Grund der angelegten Spannung zur positiv geladenen Anode. Eine Auftrennung erfolgt nur nach Größe, wobei Proteine mit hohem Molekulargewicht langsamer wandern als Proteine mit geringem Molekulargewicht. Es wurde ein System verwendet, bei welchem zunächst alle Proteine ein Sammelgel durchlaufen und synchron durch einen Konzentrations- und pH-Sprung ins darunter liegende Trenngel einlaufen (Laemmli, 1970). Die Prozentigkeit der Trenngele richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und lag im Bereich von 7,5-12,5%. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 5fach SDS-Probenpuffer (375 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, 12% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol) versetzt, der zur Denaturierung der Proteine und Reduktion aller Disulfidbrücken der Proteine führt. Alle Proben wurden anschließend für 5-10 min bei 95°C aufgeköcht. Zum Abgleich der Proteingröße wurden der „Low Molecular Weight Standard“ und „High Molecular Weight Standard Mixture“ (Sigma Aldrich) bzw. „Prestained-Marker P7708S“ (New England Biolabs) verwendet. Das Gel lief in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,7, 0,1% SDS, 400 mM Glycin). Die Elektrophorese Bedingungen betrugen dabei im Sammelgel 15 mA und im Trenngel 25 mA pro Gel bei jeweils 220 V. Die Proteinbanden konnten dann mit „Coomassie Brilliant Blue“ Färbelösung (10% Eisessig, 25% Isopropanol, 0,025% Coomassie-Brilliantblau) sichtbar gemacht werden, indem die Gele in der Lösung erhitzt und über 30 min abgekühlt wurden. Durch eine Entfärbelösung (10% Eisessig, 12,5% Isopropanol) wurde überschüssiger Farbstoff entfernt.

2.4.2 Western Blot

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachzuweisen, wurde der Western-Blot (Immunoblot) eingesetzt. Zum Transfer der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Trägermembran (Schleicher & Schuell, Dassel) wurde ein „Semi-Dry-Verfahren“ angewendet. Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese kurz in Blotpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,5 150 mM Glycin, 10% Methanol) äquilibriert und

anschließend 1 h bei 100 mA pro Gel ($2\text{--}3\text{ mA/cm}^2$) geblottet. Während des Vorgangs befanden sich die Nitrozellulose-Membran und das SDS-Gel zwischen je 3 Lagen Whatman-Filterpapier. Nach dem Blotten wurde zur Kontrolle des Protein-Transfers und zur Kennzeichnung der Markerbanden eine durch Wasser reversible Ponceau-Rot-Färbung (Sigma Aldrich) durchgeführt.

2.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern

Zum Nachweis von auf Nitrozellulose-Trägermembranen immobilisierten Proteinen wurden Primärantikörper eingesetzt, die mit Hilfe von Enzym-gekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörpern dargestellt werden konnten. Hierdurch erreicht man eine Signalverstärkung, da polyklonale Antikörper mehrere Epitope eines Primärantikörpers besetzen und selbst geringste Proteinmengen nachgewiesen werden können. Die in dieser Arbeit für Entwicklungen von Nitrozellulose-Trägermembranen verwendeten Sekundärantikörper waren alle Meerrettichperoxidase (HRP = horseradish-peroxidase) gekoppelt.

Die Nitrozellulose-Membran wurde zunächst für 1 h bei RT mit 5% Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris/HCl pH 8,8, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Das Milchpulver wurde durch kurzes Waschen mit 1x TBS-T-Puffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem in TBS-T + 1% BSA (Rinderserumalbumin) entsprechend verdünnten Erstantikörper für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt, bevor der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper (verdünnt in TBS-T + 1% BSA) für 30–60 min bei RT zugegeben wurde. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBS-T und einmal für 20 min mit TBS-X (1% Triton-X-100 in TBS-T) gewaschen. Der Nachweis der mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper erfolgte mit dem „Enhanced Chemiluminescence System“ (= ECL, Amersham). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und Wasserstoffperoxid und löst dabei Chemilumineszenz aus. Das dabei entstehende Licht reagiert mit den Silberhalogeniden des Röntgenfilms, der zuvor auf die Nitrozellulose-Trägermembran aufgelegt wurde. Durch eine Oxidation des Entwicklers (Hydrochinon) entsteht metallisches Silber. Zur ECL-Entwicklung wurden ECL-Lösung I und ECL-Lösung II nach Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und der Blot darin für 1 min inkubiert. Überschüssiges ECL-Reagenz wurde auf einem Whatmanpapier abgestreift, der Blot wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und auf einen ECL-Film aufgelegt.

2.4.4 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine hnRNP C2, PTB1, Raver1, Raver2, sowie verschiedene Mutanten und Deletionskonstrukte (siehe Anhang: Abbildung 47) dieser Proteine exprimiert und aufgereinigt. Die cDNA-Konstrukte, die in verschiedenen, für die bakterielle Expression geeigneten Vektoren exprimiert werden sollten (siehe Kapitel 2.1.5), wurden zunächst in entsprechende *E.coli* Bakterien transformiert. Die Expression in *E.coli* erfolgte in den Stämmen BL21(DE3) und ER2566. Beide Stämme tragen das pRep4-Plasmid, welches für den lac-Repressor kodiert und zudem eine Kanamycin-Resistenz aufweist. Über dieses Plasmid lässt sich die Expression mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) kontrollieren, da es an den lac-Repressor bindet und ihn so inaktiviert (Slupska et al., 1999).

2.4.4.1 Expression von rekombinanten Proteinen in *E.coli*

Eine ü.N. Kultur der transformierten Bakterien wurde 1:50 in einem Liter 2YT-Medium angeimpft. Zusätzlich wurde das Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, sowie die Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Prolin und das Vitamin Thiamin (je 50 μ g/ml) hinzugegeben. Die Kulturen wurden anschließend bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0,6 – 0,8 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die bewachsenen Kulturen wurden nach 3 h durch Zentrifugation bei 6500 rpm für 15 min geerntet und das erhaltene Bakterienpellet in 40ml des entsprechenden Lysispuffers (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 0,5% Tween 20) resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und Chelate[®]-P-Kügelchen (immobilisiertes EGTA, Serva) wurden die Bakterien bis zur Aufreinigung bei -70°C eingefroren.

2.4.4.2 Aufreinigung mittels His-„tag“ markierter Proteine über Ni-NTA Agarose beads

Die mit einem His-„tag“ versehenen rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe einer Ligandenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine binden hierbei über ihren N-terminalen Fusionsanteil bestehend aus sechs Histidinen an Nickel-

Nitriloessigsäure (Ni-NTA, Qiagen) gebunden, welche wiederum an eine Matrix aus Agarose gekoppelt wurde. Um die rekombinanten Proteine unter nativen Bedingungen aufzureinigen, wurde das Zelllysate zunächst bei 37°C aufgetaut und sofort mit Proteaseinhibitoren [AEBSF: 0,2 M in H₂O (1:500), PepstatinA: 1 mM in Ethanol (1:500), Leupeptin: 10 mM in H₂O (1:500), Trasylol: 2,8 mg/ml in H₂O (1:500)] und β -Mercaptoethanol (1:1000) versetzt. Alle folgenden Schritte fanden auf Eis, bzw. bei 4°C statt. Die Zellen wurden per Ultraschall (4x 30 s Intervalle bei 80 W) oder mittels „French-Press“ aufgeschlossen und anschließend 30 min bei 14000 g abzentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt befanden sich die löslichen Proteine im Überstand, der auf die zuvor durch zweimaliges Waschen mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben wurde. Es folgte eine ein- bis dreistündige Inkubation unter Schwenken auf Eis, durch die die Bindungsstärke der Proteine an die Matrix erhöhte wurde. Um die unspezifische Bindung von Proteinen zu verhindern, wurde zweimal mit Lysispuffer, zweimal mit Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 6,0, 300 mM NaCl, 0,5% Tween 20, 8,7% Glycerin, frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol) und zweimal mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 6,7, 100 mM KCl, 0,5 mM EGTA, 25 mM EDTA, 0,1% Triton-X-100, frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol) ohne Histidin gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 150 mM Histidin zum Elutionspuffer. Nach jeweils einer kurzen Inkubationszeit (5-10 min) wurden 3-5 Elutionsfraktionen von je 1-2 ml gesammelt. Diese wurden mit einer Ponceau-Rot-Färbung auf einer Nitrozellulose-Membran auf ihren Proteingehalt untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels einer PD10-Säule (Amersham) in den gewünschten Puffer umgepuffert (s. Kapitel 2.4.6.2). Um die Aufreinigung der Proteine zu verfolgen, wurden Gelproben der einzelnen Aufreinigungsschritte genommen, per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Coomassie Brilliant Blue Färbung und Immunoblot analysiert.

2.4.4.3 Aufreinigung mittels GST-„tag“ markierter Proteine über Glutathion Sepharose 4 Fast Flow beads

Die mit einem GST-Fusionsanteil versehenen rekombinanten Proteine wurden ebenfalls chromatographisch aufgereinigt. GST (Glutathion-S-Transferase) ist ein 26 kDa-Protein aus *Schistosoma japonicum*, welches N- bzw. C-Terminal an das zu exprimierende Protein fusioniert wurde (siehe Abbildung 47). GST dient als Affinitäts-„tag“ und der Erhöhung der

Löslichkeit des Zielproteins (Frangioni & Neel 1993). Das Substrat von GST ist das Glutathion, wodurch eine Aufreinigung über Glutathion-Sepharose-Beads 4 Fast Flow (Amersham) möglich ist.

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über Glutathion-Sepharose-Beads 4 Fast Flow erfolgte nach Herstellerangaben und unterscheidet sich von der Ni-NTA-Aufreinigung einzig durch veränderte Wasch- (PBS, pH 7,3) und Elutionspufferbedingungen (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) und die Elution mit 20 mM reduziertem L-Glutathion.

2.4.4.4 Funktionelle Reinigung von Proteinen mittels Oligo(dt)-Säulen

PTB-Protein wurde nach der unter 2.4.4.3 beschriebenen Aufreinigung mittels Glutathion einer weiteren Aufreinigung über Oligo(dt)-Säulen unterzogen, um zu gewährleisten, dass ausschließlich funktionelles Protein für die biochemischen Assays verwendet wurde. Da PTB spezifisch an Pyrimidine bindet, konnte eine Affinitätsreinigung über Beads vorgenommen werden, an denen Pyrimidine gekoppelt waren (Amersham GST-Gene Fusion System handbook). Dazu wurden 0,2 g Oligo dT Cellulose Type 7 (Amersham) mit 3 ml Wasser versetzt und für 15 min bei 4°C zum Quellen inkubiert. Nach einer Zentrifugation der Beads für 5 min bei 3000 g und 4°C, wurde das Pellet in 10 ml Säulenpuffer + 100mM KCL (20 mM Hepes pH 7,9, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% Glycerin, 0,05% NP-40) für 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend auf eine Säule gegeben. Diese wurde erneut mit 10 ml Säulenpuffer gewaschen, bevor das zuvor rekombinant aufgereinigte Protein hinzu gegeben wurde. Die nicht funktionell bindenden Proteine wurden mit 10 ml Säulenpuffer heraus gewaschen. Gebundenes Protein konnte folglich mit steigender KCl-Konzentration im Säulenpuffer (200 mM - 1000 mM) eluiert werden. Die Fraktionen der Eluate wurden anschließend im Coomassie SDS-Gel auf Proteingehalt analysiert.

2.4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.4.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford basiert auf der Reaktion von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Bradford, 1976). Der Farbstoff reagiert mit

basischen und aromatischen Aminosäuren, und bildet Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweisen, während ungebundener Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Da die Absorptionsänderung über einen großen Bereich linear von der Proteinkonzentration abhängt, ist es darüber möglich die Konzentration von Proteinlösungen zu ermitteln.

Je 20 µl Proteinlösung wurde in einer 96-well-Platte mit 100 µl Bradford-Reagenz (Sigma Aldrich) versetzt und nach 10 min Inkubation bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Readers gemessen. Es wurden jeweils Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. Anhand einer Eichgerade mit BSA (Konzentration zwischen 25-200 µg/ml) wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.4.5.2 Densitometrischer Proteinabgleich

Ein Abgleich von Proteinmengen wurde durch densitometrische Analysen erreicht. Es wurden definierte Mengen der zu analysierenden Proteine sowie definierte Mengen BSA, dessen Konzentration bekannt war, auf ein SDS-Gel geladen. Die Gele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt und mit Hilfe des Programms Easywin (Herolab) densitometrisch vermessen. Die digitalisierten Densitogramme wurden anschließend einer Clusteranalyse unterworfen, wodurch sich die Menge des zu untersuchenden Gesamtproteins im Vergleich zum BSA abschätzen ließ.

2.4.6 Umpuffern von Proteinen

Um die aufgereinigten Proteine in die für die folgende Experimente erforderlichen Puffersysteme zu überführen, wurden die zwei im folgenden dargestellten Methoden eingesetzt.

2.4.6.1 Umpuffern von Proteinen mittels Gelfiltration: PD10-Säulen

Über eine PD10-Säule (Pharmacia) lassen sich Volumina von bis zu 2,5 ml umpuffern. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 ml des Zielpuffers (PTB-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,4,

100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 5% Glycerin; frisch 0,5 mM DTT und Proteaseinhibitoren 1:500) äquilibriert. Im Anschluss konnte ein Gesamtvolumen von 2,5 ml Probe aufgetragen werden. War das Probenvolumen geringer, wurde mit PTB-Puffer auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml PTB-Puffer. Anschließend wurde die Säule mit 25 ml PTB-Puffer gewaschen und konnte so für gleiche Proteine erneut verwendet oder ggf. bei 4°C gelagert werden.

2.4.6.2 Umpuffern von Proteinen mittels Dialyse

Die Dialyse ist eine einfache und wirkungsvolle Methode zum Entsalzen oder Umpuffern von Proteinen. Die Poren der verwendeten Schläuche Spectra/Por[®] CE (Spectrum, Houston, Texas) erlauben Molekülen bis zu einer Größe von 2000 Da den Durchtritt. Proteine bleiben somit im Schlauch, wohingegen Salze auf Grund des starken Konzentrationsunterschiedes durch die Poren hindurch diffundieren.

Zum Umpuffern wurde ein Schlauchstück passender Länge in 500 ml Dialysepuffer (20 mM Hepes pH 7.9, 10% Glycerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT) für 30 min äquilibriert. Der befüllte Schlauch wurde dann in 2,5 l Dialysepuffer überführt und für 5 h rührend inkubiert. Nach 5 h wurden die 2,5 l durch neuen Puffer ersetzt, um so einen höheren Entsalzungs- bzw. Umpufferungsgrad zu erhalten.

2.4.7 Ankonzentration von Proteinen

Um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu erhöhen, wurde die relativ schnelle und einfache Methode der Zentrifugation der Proteinlösung in Röhrchen mit integriertem Filter (Millipore) angewandt. Hierbei wurde die Ausschlussgrenze der Filter dem anzukonzentrierenden Protein angepasst. Bei Zentrifugation mit 4000x g kommt es zur Ansammlung des Konzentrats oberhalb des Filters. Eine 3,5 ml Ausgangslösung wurde je nach Protein und gewünschter Endkonzentration auf ein Volumen von 0,5-1 ml eingegrenzt.

2.4.8 Ribohomopolymer-Bindungs Assay

Die Fähigkeit der hier analysierten Proteine an Ribonukleotide zu binden, wurde mit dem Ribohomopolymer-Bindungstest (modifiziert nach Akamatsu et al., 1999) analysiert. Die verwendeten Ribohomopolymer-Beads („Polyguanylic acid“ Agarose, „Polyadenylic acid“ Sepharose®4B, „Polycytidylic acid“ Agarose und „Polyuridylic acid“ Agarose, Sigma Aldrich) wurden zunächst in PBS äquilibriert. Anschließend wurden je 30 µl Ribohomopolymer-„beads“ mit 10 pmol rekombinantem Protein in einem Volumen von 400 µl RHAP-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 2,5 mM MgCl₂, 0,5% Triton-X-100, x M NaCl) 1 h rotierend bei 4°C inkubiert. Zur Erhöhung der Stringenz der Protein-„beads“-Bindung wurde der Versuch mit drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,25 M, 0,5 M und 0,8 M NaCl) durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die „beads“ fünfmal mit RHAP-Puffer und der entsprechenden NaCl-Konzentration gewaschen, in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C aufgeköcht, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot analysiert.

2.4.9 „Dot-Overlay“ Assay

Intermolekulare Protein-Protein Wechselwirkungen können im "Dot-Overlay" nachgewiesen werden. Im vorliegenden Fall wurden die Protein-Protein Interaktionen mit Hilfe von *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Konstrukten durchgeführt.

2.4.9.1 *In vitro* Transkription und Translation

Der „TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Kit“ (Promega) bietet die Möglichkeit, in einem Schritt Plasmid-DNA zu transkribieren und die daraus resultierende mRNA zu translatieren. Dies ist durch den kombinierten Einsatz von T7-RNA-Polymerase und aller zur Translation erforderlichen Proteine, Aminosäuren und Zellbestandteile möglich, die in einem Lysat aus Kaninchenretikulozyten enthalten sind. Die Protein codierende DNA-Sequenz wird in einen Vektor kloniert, in dem die Sequenz unter Kontrolle eines eukaryotischen Promotors steht. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür Konstrukte im pcDNA3-Vektor verwendet. Mit Hilfe der eukaryotischen Polymerase wurde *in vitro* mRNA hergestellt und diese simultan im

Retikulozytenlysate translatiert. Wird das zum Einbau zur Verfügung gestellte [^{35}S]-Methionin eingebaut, werden alle neu synthetisierten Proteine radioaktiv markiert.

Für einen Ansatz wurden etwa 0,5 µg Plasmid-DNA mit 12 µl Retikulozytenlysate versetzt und auf ein Volumen von 14,4 µl mit nukleasefreiem H_2O aufgefüllt. Auf diesen Mix wurden 6 µCi (0,6 µl) [^{35}S]-Methionin gegeben, so dass das Endvolumen 15 µl betrug. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei 30°C inkubiert und konnte anschließend für den „Dot-Overlay“ verwendet werden. Zum Nachweis der erfolgreichen Translation wurden 2,5 µl des Reaktionsansatzes mit 8 µl SDS-Probenpuffer (+10% β -Mercaptoethanol) versetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Über Autoradiographie (siehe Kapitel 2.4.9.3) konnten so die translatierten Proteine nachgewiesen werden.

2.4.9.2 Radioaktiver „Dot-Overlay“ Assay

Für den „Dot-Overlay“ Assay wurden je 25 pmol der rekombinanten Proteine, die als potentielle Liganden der zu untersuchenden Proteine in Frage kamen auf einer Nitrozellulose-Membran mit Hilfe eines Vakuum-Spotters (Biometra) immobilisiert. Zur Überprüfung der Adsorption wurde eine durch Wasser reversible Ponceau-Rot-Färbung durchgeführt. Die in Streifen geschnittene Membran konnte daraufhin mit 5% Milchpulver in TBS-T ü.N. bei 4°C abgesättigt werden. Nach zweimaligem Waschen mit 0,5% Milchpulver in TBS-T (+ 0,1% β -Mercaptoethanol) wurde die Membran mit je 12,5 µl der zuvor *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Konstrukte für 3 h bei RT inkubiert. Um nach der Inkubation die überschüssige Radioaktivität zu entfernen, wurden die Membranstreifen dreimal für 20 min gründlich mit TBS-T gewaschen. Nachdem die Membranen getrocknet wurden, konnten sie mittels Autoradiographie analysiert werden.

2.4.9.3 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine lassen sich durch Autoradiographie nachweisen. Nachdem die Moleküle auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert wurden, konnte auf die Membran ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR Film) gelegt werden und ü.N. bei -70°C in einer

Bleikassette exponiert werden. Da [^{35}S]-Methionin β -Strahlung mit niedriger Energie abgibt, verwendet man zusätzlich eine Verstärkerfolie (Kodak BioMax TranScreen).

2.4.10 PTB1-GST Pulldown

Der Pulldown-Assay wird genutzt, um Proteine mittels spezifischer Interaktionen zu präzipitieren. Das für den Versuch eingesetzte „Pull-Konstrukt“ war das rekombinant aufgereinigte PTB1-GST Protein (siehe Abbildung 47), welches durch seinen GST-Fusions-„tag“ an Glutathion-Sepharose-Beads 4 Fast Flow binden kann.

50 μl PTB1-GST (2 μg) in PTB-Puffer (20 mM Hepes pH 7,4, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 5% Glycerin; frisch 0,5 mM DTT und Proteaseinhibitoren 1:500) wurden mit 50 μl des zu analysierenden Proteins (2 μg) bei 30°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Proteingemisch für 1,5 h mit 80 μl Glutathion-Sepharose-Beads bei RT auf einer Wippe geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 μl PBS wurden die Beads mit 40 μl 5fach SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min aufgekocht und 10 min bei 13000x g zentrifugiert. Der Überstand konnte daraufhin durch SDS-Page und Immunoblot analysiert werden. Als Negativ-Kontrolle wurde für diesen Versuch rekombinant aufgereinigtes GST als „Pull-Konstrukt“ verwendet, um unspezifische Interaktionen mit GST auszuschließen zu können. Der Pulldown-Assay wurde ebenfalls mit radioaktiv markierten Proteinen durchgeführt, wobei als potentielle Liganden *in vitro* translatierte Proteine verwendet wurden.

2.4.11 Herstellung von Zellextrakten

Zur Analyse des gesamten Proteingehalts von Zellen im Immunoblot wurden Zellextrakte hergestellt. Die Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) gewaschen und konnten anschließend mit einem Zellschaber geerntet werden. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde das Zellpellet in 100 μl Lysispuffer (5 mM Tris/HCl pH 6,8, 5 mM EDTA, 5 mM KCl, 0,2% SDS, frisch: Proteaseinhibitoren 1:500) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde die Suspension mehrmals in einer Spritze mit einer feinen Kanüle (26G) geschert und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde mittels

Bradford-Proteinbestimmung bestimmt und die Extrakte mit SDS-Probenpuffer auf eine spezifische Konzentration eingestellt.

2.4.12 Herstellung von Gewebeextrakten

Für die Herstellung von Gewebeextrakten aus Maus-Organen, wurden diese zunächst mit PBS mehrfach gespült sowie Bindegewebe und Fett entfernt. Anschließend wurden die Organe mit STKM-Puffer (250 mM Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, frisch: Proteaseinhibitoren (1:500)) + 0,2% SDS überschichtet und im Ultra Thurrax T24 zerkleinert. Der Zellaufschluss der gereinigten Gewebe erfolgte mechanisch durch den Einsatz von Dounce-Homogenisatoren aus Glas. Die Gewebe wurden solange homogenisiert, bis der Stempel gleichmäßig durch die Probe glitt. Nach anschließender Zentrifugation bei 13000 g für 10 min wurden die Überstände abgenommen und die Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Durch Zugabe einer definierten Menge SDS-Probenpuffer konnten die Proben im SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert werden.

2.4.13 Protein-RNA UV-„Cross-Link“

Der Protein-RNA UV-„Cross-Link“ ist eine einfache Methode zum Nachweis von Protein-RNA Interaktionen *in vitro*. In 30 µl Reaktionsvolumen wurde zunächst folgender Reaktionsansatz pipettiert und für 1 h bei 30°C rotierend (1000 rpm) inkubiert.

0,5 µg	rekombinantes Protein
10 µg	total-RNA
3 µl	RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega)
6 µl	5xBindungs-Puffer (25 mM Hepes pH 7,6, 125 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM EDTA, 19% Glycerin)

Anschließend wurde der Ansatz in eine 96 Lochplatte überführt und für 10 min im UV-Stratalinker (Stratagene) mit UV-Licht bestrahlt. Im Anschluss an die Vernetzung der sich gebildeten Protein-RNA-Komplexe wurden 25 µl des Reaktionsansatzes mit 0,5 µl RNase T1 (1:500 vorverdünnt, Promega) für 10 min bei 37°C rotierend (1000 rpm) inkubiert. Die am Protein gebundene RNA wurde durch die Zugabe von 20 µCi [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP und 3 µl Polynukleotidkinase (Fermentas) bei 37°C für 20 min radioaktiv markiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min mit 2,5 µl 1 mM ATP. Durch die Zugabe von 9 µl NuPAGE-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel und einer Inkubation von 10 min bei 70°C wurde die Reaktion gestoppt. 30 µl des Reaktionsansatzes wurden auf ein 10% Bis-Tris NuPAGE-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen) im MOPS-Laufpuffer (50 mM MOPS, 5 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA pH 7,7). Die Proben wurden anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und durch Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung der Protein-RNA-Bindung erfolgte über den Grad der mit [^{32}P]-Phosphat markierten RNA. Dazu wurden die radioaktiven Bereiche aus der Nitrozellulose-Membran herausgeschnitten und die Radioaktivität durch Cerenkov-Zählung im Szintillationszähler gemessen.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Medium, Kulturgefäße und Kulturbedingungen

Für die Kultivierung tierischer Zellen wurde als Kulturmedium „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) von PAA Laboratories (Pasching, Österreich) verwendet, welches mit 10% FCS (Fötales Kälberserum) versetzt wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C, 10% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturgefäßen der Firma Nunc (Wiesbaden).

2.5.2 Passagieren von Zellen

Das Passagieren von Zellen erfolgte je nach Zelldichte und Stoffwechselaktivität nach 2-4 Tagen. Zum Umsetzen der Zellen in neue Kulturgefäße wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen

gegeben und bei 37°C inkubiert, bis die Zellen abgerundet waren und sich vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch die Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellzahl konnte daraufhin mittels Neubauer Zählkammer bestimmt werden und die Zellen in einer definierten Zellzahl neu ausgesät werden.

2.5.3 Transiente Transfektion von Zellen

2.5.3.1 Transfektion mit Metafectene™ Transfektionsreagenz

Metafectene™ (Biontex, Martinsried) ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit einem neutralen Co-Lipid in liposomaler Form vorliegt und für eine effiziente Transfektion eingesetzt werden kann. Für die Transfektion der Minigen-Plasmide in HeLa- und MEF-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion 1×10^5 Zellen in 6-well Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA in 100 µl serumfreiem DMEM-Medium - und in einem separaten Gefäß 30 µl Metafectene™ im gleichen Medium gelöst (Endvolumen 100 µl). Beide Lösungen wurden vereint, in dem die DNA-Lösung in die Metafectene™-Lösung gegeben wurde (nicht umgekehrt!). Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur, konnte der Mix tropfenweise zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 24 h inkubiert und auf die Expression des transfizierten Gens analysiert.

2.5.3.2 Transfektion von siRNA mit Lipofectamine™ 2000

Für die transiente Transfektion von siRNA in HeLa und HEK Zellen wurde das Reagenz Lipofectamine™2000 verwendet (Invitrogen), welches ebenfalls zu den kationischen Lipiden zählt. Die Transfektion in 6-well-, 6 cm- und 10 cm-Zellkulturschalen erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Zusammensetzung des Reaktionsmix am Beispiel einer 6-well-Zellkulturschale:

- 100 pmol siRNA in 250 µl Opti-MEM® Medium
- 5 µl Lipofectamine™2000 in 250 µl Opti-MEM® Medium

2.5.3.3 Transfektion von siRNA mit TransIT®-LT1

Als weiteres Reagenz auf Basis kationischer Lipide wurde für die Transfektion von Minigen-Konstrukten TransIT®-LT1 (Mirus, Madison, USA) verwendet. Für die Transfektion der Minigen-Plasmide in MEF-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion 1×10^5 Zellen in 6-well Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden 250 µl DMEM-Medium je 6-well-Zellkulturschale in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 3 µl TransIT®-LT1 hinzu gegeben. Nach kurzem Vortexen und einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 1 µg Plasmid-DNA zu dem Mix pipettiert und erneut 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der Mix tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde, konnten diese nach 24 h Inkubation auf die Expression des transfizierten Gens analysiert werden.

2.5.4 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Nach der Transfektion und Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen für Immunfluoreszenzstudien mussten die Zellen vor der Antikörperinkubation fixiert und permeabilisiert werden. Zunächst wurde das Medium durch dreimaliges waschen mit PBS entfernt und die Zellen bei RT mit 4% Formaldehyd-Lösung (PFA) in PBS für 20 min fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 0,2 % Triton-X-100 in PBS 15 min permeabilisiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

2.5.5 Fluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine

2.5.5.1 Indirekter Nachweis

Mit der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich strukturegebundene Proteine in Zellpräparaten spezifisch und mit einer hohen Auflösung darstellen. Die Verwendung eines spezifischen Primärantikörpers und eines Fluorochrom-markierten Spezies-spezifischen Sekundärantikörpers bewirken eine Verstärkung der Fluoreszenzidentität (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2).

2.5.5.2 Direkter Nachweis

Bei der direkten Fluoreszenz wurden überexprimierte Proteine über ihren EGFP-Fusionsanteil direkt nachgewiesen.

Die Darstellung des Kernes erfolgte über den Hoechst-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) der spezifisch mit DNA in Wechselwirkung tritt und somit den Zellkern markiert.

2.5.5.3 Immunfluoreszenz

Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der zu untersuchenden Proteine die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 1% BSA in PBS zur besseren Benetzung der Deckgläschen inkubiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, der spezifisch das zu untersuchende Protein erkennt, erfolgte für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen und wiederum für 10 min mit 1% BSA in PBS überschichtet. Die Inkubation mit dem Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurden die Präparate für 15 min mit dem Kernfarbstoff DAPI inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS eingebettet.

2.5.5.4 Einbetten der Präparate

Zur Einbettung der Fluoreszenzpräparate wurden die Deckgläschen in MQ-H₂O geschwenkt, und anschließend leicht getrocknet. Bevor die Präparate mit den Zellen nach unten auf gereinigten Objektträgern eingebettet werden konnten, wurde auf die Objektträger Mowiol (40 g Mowiol 4-88 (Hoechst), 80 ml 1xPBS, 40 ml reinst. Glycerin) gegeben, welches zuvor mit Bleischutz in einem Verhältnis von 3+1 versetzt wurde. Die fertigen Präparate wurden 24 h bei RT getrocknet und unter Verwendung geeigneter Filtersätze am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Dokumentation wurden mit der CCD-Kamera VarioCam Intas Bilder aufgenommen, die dann mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Metamorph[®] (UIC, Downingtown, USA) bearbeitet werden konnten.

3 Ergebnisse

Die Zuordnung von Raver1 zu den RNA-bindenden Proteinen der hnRNP-Familie erfolgte bisher ausschließlich auf Grund von Computer-basierten Sequenzanalysen, die drei RRM-s im N-Terminus des Proteins vorhersagen (Hüttelmaier et al., 2001). Eine direkte Interaktion von Raver1 mit RNA konnte bisher jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen anhand von Minigen-Analysen in PAC1-Zellen deuten jedoch auf eine indirekte Beteiligung von Raver1 an der Prozessierung von RNA hin. Es wird vermutet, dass Raver1 durch seine Interaktion mit dem Spleißfaktor PTB als Co-Repressor desselben fungiert und somit das alternative Spleißen von PTB-Ziel-RNAs beeinflusst (Gromak et al., 2003a; Rideau et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst *in vitro* die direkte Bindung von Raver1 und dem verwandten Protein Raver2 an RNA untersucht (Kapitel 3.1) sowie die Assoziation beider Proteine an PTB näher charakterisiert (Kapitel 3.2). Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung endogener, PTB-vermittelter Spleißprozesse in Raver1-defizienten Mäusen. Diese Analysen wurden durch RNAi-Experimente in Zellkulturen komplementiert (Kapitel 3.3).

3.1 RNA Bindungsanalysen von Raver1 und Raver2 *in vitro*

Die Mitglieder der hnRNP-Familie sind über ihre RNA-Bindungsdomänen (RRM, KH, Glycinboxen) charakterisiert. Diese hoch konservierten Bereiche vermitteln den Proteinen unter anderem eine spezifische Interaktion mit RNA-Molekülen und gewährleisten somit die Funktionen der hnRNP-Mitglieder als RNA-Stabilisatoren oder Spleißregulatoren (Maris et al., 2005; Cléry et al., 2008). Sequenzanalysen weisen für Raver1 und Raver2 je drei N-terminale RRM-Domänen aus, deren Funktionalität bisher jedoch nicht gezeigt werden konnte. Im Folgenden sollte daher zunächst analysiert werden, ob über die RRM-s tatsächlich eine Bindung an RNA *in vitro* erfolgen kann.

3.1.1 *In vitro* Analysen zur RNA-Bindung der Raver-RRM Domänen

Um die RNA-Bindung der Raver-Proteine näher zu analysieren, wurde zunächst eine *in vitro* Methode verwendet, bei der rekombinante Proteine mit RNA-imitierenden Agarose-Kügelchen (im Folgenden als „beads“ bezeichnet) inkubiert werden. Im so genannten „Ribohomopolymer-binding assay“ (RiHoPB-Test) werden Ribohomopolymere verwendet, welche kovalent an die Agarose-beads gekoppelt sind. Die zu testenden Proteine werden separat mit Riboadenosin-, Riboguanosin-, Ribocytidin- und Ribouridin-beads inkubiert. Um die Stringenz der Bindung der Proteine an die Ribohomopolymere zu erhöhen, werden die Inkubationen in Anwesenheit steigender Salzkonzentrationen (0,2 M - 0,8 M NaCl) durchgeführt. Proteine, die selektiv an diese Ribohomopolymere binden, können anschließend mittels Zentrifugation mit den jeweiligen beads co-sedimentiert werden. Die Analyse der sedimentierten Proteine erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Immunoblot-Verfahren. Als Positiv-Kontrollen wurden im RiHoPB-Test rekombinantes PTB und hnRNP C2 eingesetzt. Zur Analyse der RNA-Bindung beider Raver-Proteine wurden ebenfalls jeweils die rekombinanten Gesamtproteine verwendet. Während PTB, hnRNP C2 und Raver2 bakteriell exprimiert werden konnten, wurde rekombinantes Raver1-Protein aus Insektenzellen isoliert (die Zellen wurden freundlicherweise von J. van den Heuvel, HZI Braunschweig zur Verfügung gestellt).

Der in Abbildung 10 dargestellte Immunoblot zeigt die Ergebnisse des RiHoPB-Tests verschiedener hnRNP-Mitglieder. hnRNP C2 bindet unter nicht stringenten Pufferbedingungen an alle vier Ribohomopolymere. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration beschränkt sich die Interaktion auf Riboguanosin und Ribouridin (0,8 M NaCl). Diese Bindung stimmt mit der in der Literatur beschriebenen RNA-Bindung von hnRNP C2 überein (Swanson & Dreyfuss, 1988). PTB bindet bei 0,2 M NaCl an fast alle beads mit Ausnahme von Riboadenosin. Bei steigender Salzkonzentration (0,8 M NaCl) ist lediglich die Bindung an Ribouridin nachweisbar. Dies entspricht der Tatsache, dass PTB ein Polypyrimidin-bindendes Protein ist (Garcia-Blanco et al., 1989). Im Gegensatz zu hnRNP C2 und PTB konnte weder für Raver1 noch für Raver2 eine Bindung mit einem der Ribohomopolymere nachgewiesen werden. Diese Daten stimmen ebenfalls mit früheren Beobachtungen überein (Dissertation B. Henneberg, 2006).

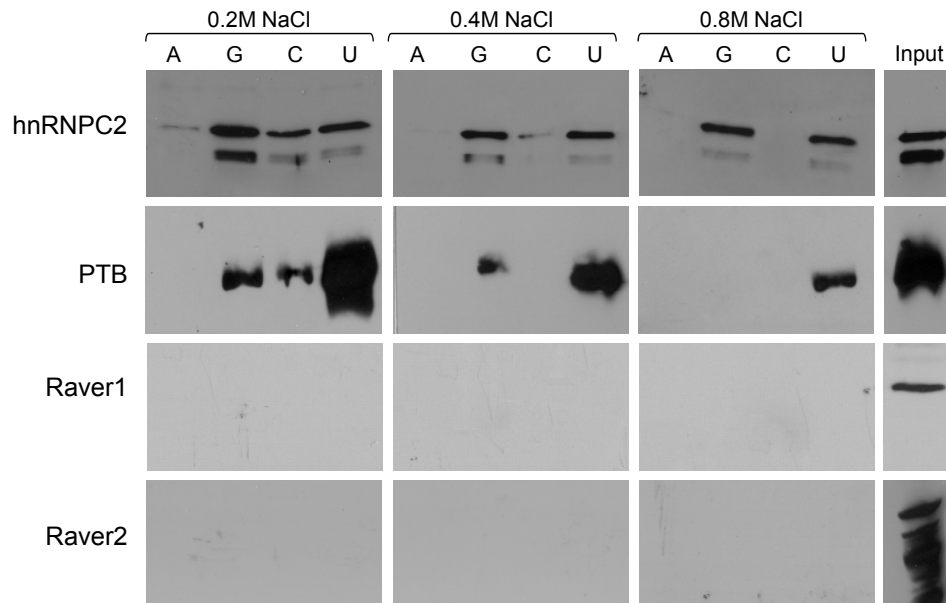


Abbildung 10: Raver-Gesamtproteine binden nicht an Ribohomopolymere. Immunoblot-Analysen des RiHoPB-Tests verschiedener hnRNPs. Es wurden jeweils 25 pmol des zu untersuchenden rekombinanten Proteins (Input) mit einer der Ribohomopolymer-Agarosen (Riboadenosin- (A), Riboguanosin- (G), Ribocytidin- (C) oder Ribouridin-Agarosen (U)) inkubiert. Zur Erhöhung der Stringenz wurden verschiedene Salzkonzentrationen verwendet (0,2 M – 0,8 M NaCl). Der Nachweis von gebundenem Protein nach Zentrifugation der Agarose-beads erfolgte nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel mittels Immunoblot. Zur Detektion der Proteine hnRNP C2 und PTB1 wurde der FLAG-Antikörper verwendet. Der Nachweis des Raver1-Proteins erfolgte durch den monoklonalen Raver1-Antikörper 5G6, wohingegen das Raver2-Protein mittels BiPro-Antikörper (4A6) nachgewiesen wurde.

Die Tatsache, dass beide Raver-Gesamtproteine nicht an Ribohomopolymere binden, muss allerdings nicht zwangsweise bedeuten, dass die RRM's prinzipiell nicht in der Lage sind an RNA zu binden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass intramolekulare Wechselwirkungen der RRM's mit den C-Termini der Raver-Proteine eine Assoziation mit RNA verhindern. Aus diesem Grund wurden Deletionskonstrukte hergestellt, die lediglich die RRM's von Raver1 (AS 52-335) und Raver2 (AS 11-219) umfassten (siehe Anhang Abbildung 47). Beide Konstrukte wurden N-Terminal mit einem FLAG-„tag“ versehen, um den anschließenden Nachweis im Immunoblot zu ermöglichen. Die Aufreinigung erfolgte über einen ebenfalls N-terminal lokalisierten His-Fusionsanteil und dessen Bindung an Ni-NTA-Agarose (Kapitel 2.4.4.2).

In Abbildung 11 sind neben dem Schema des verwendeten Raver1-RRM-Konstrukts im Vergleich zum Gesamtprotein der Immunoblot der Ni-NTA-Aufreinigung sowie die Analysen der Raver1-RRM's im RiHoPB-Test dargestellt. Es wird ersichtlich, dass das Raver1-RRM-Protein unter nicht-stringenten Pufferbedingungen an Riboguanosin und schwach an Ribocytidin bindet. Lediglich die Interaktion mit Riboguanosin kann auch noch bei Salzkonzentrationen von 0,8 M NaCl nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Raver1-

Gesamtprotein weisen die isolierten RRMs somit eine spezifische und selektive Assoziation an RNA (Riboguanosin) auf.

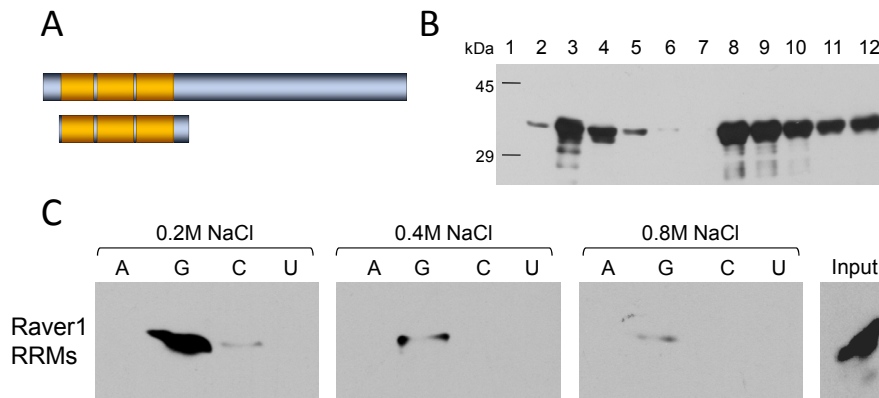


Abbildung 11: Die RRM-Domänen von Raver1 binden an Ribohomopolymere. (A) Vereinfachte Darstellung des verwendeten Raver1-RRM-Konstrukts (unten) im Vergleich zum Gesamtprotein (oben). (B) Immunoblot der Ni-NTA-Aufreinigung von Raver1-RRM. In den einzelnen Spuren wurden folgende Proben aufgetragen: (1) „High molecular weight“ Marker (2) Bakteriensuspension vor Induktion, (3) Bakteriensuspension nach Induktion, (4) Überstand des Bakterienextraktes nach Zentrifugation, (5) Überstand des Bakterienextraktes nach Inkubation mit Ni-NTA, (6-7) Waschfraktionen, (8-12) Protein-Elutionsfraktionen. (C) Immunochemischer Nachweis des RiHoPB-Tests der Raver1-RRMs. Es wurde je 25 pmol rekombinantes Protein (Input) mit den angegebenen Ribohomopolymeren unter verschiedenen Salzkonzentrationen (0,2 M – 0,8 M NaCl) inkubiert. Der Nachweis des Raver1-RRM-Konstrukts im Immunoblot erfolgte mittels FLAG-Antikörper.

Die entsprechenden Analysen für das Raver2-RRM-Konstrukt sind in Abbildung 12 dargestellt. Das aufgereinigte rekombinante Protein wurde ebenfalls in Anwesenheit steigender Salzkonzentrationen auf die Bindung an Ribohomopolymere untersucht. Die Ergebnisse entsprechen in etwa dem Bindungsverhalten des Raver1-RRM-Konstrukts. Das Raver2-RRM-Protein interagiert ausschließlich mit Riboguanosin und diese Wechselwirkung ist bis zur einer Salzkonzentration von 0,4 M NaCl als ein deutliches Signal zu erkennen. Unter hochstringenten Bedingungen allerdings (0,8 M NaCl) konnte keine spezifische Interaktion der Raver2-RRMs mit Riboguanosin mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den RRM von Raver1 scheint somit die Bindung der Raver2-RRMs an Riboguanosin schwächer zu sein.

Sowohl die RRM von Raver1 als auch Raver2 sind demnach *in vitro* in der Lage, spezifisch an Guanotin-Ribohomopolymere unter moderaten Salzbedingungen zu binden. Vergleicht man die Assoziation beider RRM-Konstrukte an Ribohomopolymere jedoch mit der von PTB und hnRNP C2, so scheint sie insgesamt schwächer zu sein, da durch eine hohe Salzkonzentration (0,8 M NaCl) zwar die Bindung beider Raver-Proteine an RNA, nicht aber die Assoziation von hnRNP C2 und PTB an Ribohomopolymere unterbunden werden kann.

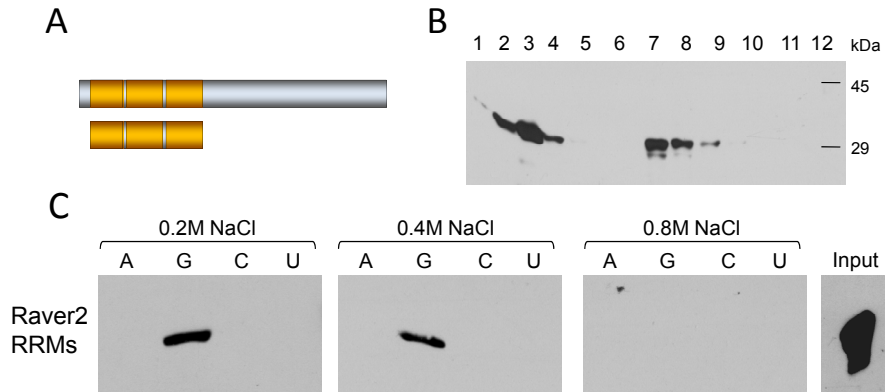


Abbildung 12: Die Raver2-RRMs sind in der Lage, mit Guanosin-Ribohomopolymeren zu interagieren. (A) Balkendarstellung der Raver2-RRMs (unten) im Vergleich zum Gesamtprotein (oben). Der immunochemische Nachweis in (B) zeigt die Aufreinigung der Raver2-RRMs über Ni-NTA-Agarose. Die Fraktionen 1-6 stellen die verschiedenen Aufreinigungsschritte dar. In den Spuren 7-11 sind die Elutionsfraktionen aufgetragen (Auftrag entsprechend zu Abbildung 11). (C) Die jeweils eingesetzten 25 pmol Raver2-RRM (Input) wurden bei steigenden Salzkonzentrationen (0,2 M -0,8 M NaCl) mit den Ribohomopolymeren PolyA, PolyG, PolyC und PolyU inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Immunoblot, in dem das Protein über den FLAG-Antikörper detektiert wurde.

In den RiHoPB-Analysen wurde mit rekombinanten Proteinen und RNA-imitierenden beads gearbeitet. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen zwar eine Interaktion der Raver-RRMs mit Riboguanosin-Agarosen, allerdings stellt diese Interaktion kritisch betrachtet keine reelle Protein-RNA Interaktion dar, wie sie in Organismen vorkommt. Zur Validierung der spezifischen Bindung der Raver-RRM-Konstrukte wurde daher ein weiterer *in vitro* Assay durchgeführt, bei dem anstatt künstlich generierter Ribonukleotid-beads RNA verwendet wurde, die aus neonatalen Mäusen präpariert worden war. Die isolierte RNA wurde zunächst mit den rekombinanten Proteinen inkubiert und die Probe anschließend einem UV-„Cross-Link“ unterzogen. Nach einem RNase-Verdau konnte die am Protein gebundene RNA durch Polynukleotidkinase radioaktiv markiert werden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Komplexe und einem anschließenden Transfer derselben auf eine Nitrozellulose-Membran, konnten potentielle Protein-RNA Interaktionen mittels Autoradiografie ermittelt werden (Abbildung 13).

Als Positiv-Kontrolle wurde PTB verwendet, für das bereits in entsprechenden Analysen eine spezifische *in vitro* Bindung an RNA nachgewiesen werden konnte (Garcia-Blanco et al., 1989; Dissertation B. Henneberg, 2006). Vergleichend hierzu wurden die Raver-Gesamtproteine, sowie deren RRM-Konstrukte analysiert. Wie erwartet zeigte PTB eine deutliche Assoziation mit RNA. Keine eindeutige Bindung konnte hingegen für beide Raver-Gesamtproteine nachgewiesen werden. Die schmale Bande des Raver1-Gesamtproteins wurde als falschpositives Signal gewertet, da sie im Vergleich zu den anderen Signalen für PTB und

die RRM-Konstrukte zu scharf umgrenzt war. Da in diesem Assay RNA-Fragmente verschiedener (zufälliger) Größen vernetzt werden, sollten die Signale immer durch Protein-RNA-Komplexe variierender apparenter Molekulargewichte entstehen und somit eher unscharf erscheinen (Ule et al., 2003). Außerdem hatten bereits frühere Analysen eine vergleichbare Bande für ein Raver1-Konstrukt (Raver1 Δ N) gezeigt, in welchem die RRMs des Proteins deletiert wurden und somit auf eine unspezifische Interaktion der RNA mit dem basischen C-Terminus von Raver1 geschlossen werden konnte (Dissertation B. Henneberg, 2006). Die RRM-Konstrukte beider Raver-Proteine wiesen im Gegensatz zu den Gesamtproteinen ein spezifisches, wenn auch schwaches Signal in der Autoradiografie auf (Abbildung 13 A). Die jeweils inkorporierte Radioaktivität wurde mittels Cerenkov-Zählung ermittelt und ist in Abbildung 13 B dargestellt. Den für PTB ermittelten radioaktiven Messungen wurde hierbei der Wert 1 zugeordnet und die Werte aller Raver-Proteine dazu in Relation gesetzt.

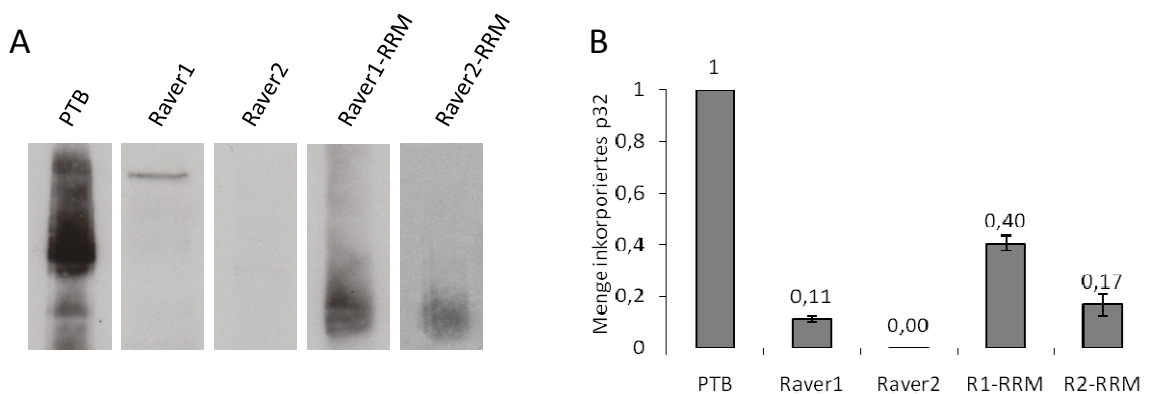


Abbildung 13: Die RRMs der Raver-Proteine binden *in vitro* an total-RNA. (A) UV-,Cross-Link“-Analysen verschiedener hnRNP-Mitglieder. 20 pmol der rekombinanten Proteine wurden mit je 10 μ g neonataler, muriner RNA einem UV-,Cross-Link“ unterzogen. Nach anschließendem RNase-Verdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine konnten die auf eine Nitrozellulose-Membran transferierten Komplexe mittels Autoradiografie nachgewiesen werden. Die Expositionszeit betrug 6 h. (B) Mittels Cerenkov-Zählung konnte die Inkorporation der Radioaktivität auf den einzelnen Membran-Abschnitten gemessen werden. Die gemessene Radioaktivität wurde für PTB = 1 gesetzt und die Werte der Raver-Proteine relativ zu diesem Wert berechnet. Die ermittelten Relationen sind im Balkendiagramm dargestellt. Das für Raver1 ermittelte Signal ist wahrscheinlich auf unspezifische Bindungen zurückzuführen (Erläuterung siehe Text).

Insgesamt weisen die UV-,Cross-Link“-Analysen dieselben Tendenzen auf, die bereits im RiHoPB-Test ermittelt wurden: Im Vergleich zu PTB zeigen beide RRM-Konstrukte eine deutlich schwächere Bindung an RNA, wobei die Raver1-RRMs stärker mit RNA zu interagieren scheinen als die Raver2-RRMs. Durch den *in vitro* UV-,Cross-Link“ konnte zudem belegt werden, dass die Interaktion der Raver-RRMs nicht auf Ribohomopolymere beschränkt ist, sondern diese Domänen auch mit reellen RNA-Motiven aus der Maus wechselwirken können.

3.1.2 Charakterisierung der RRM-Domänen von Raver1 und Raver2 mittels chimärer Proteine

Die bisherigen Analysen zeigten, dass beide Raver-Proteine in ihrer Gesamtheit nicht in der Lage sind, an RNA-Moleküle zu binden. Die RRM-Domänen beider Proteine weisen jedoch eine deutliche, wenn auch relativ schwache Bindung an RNA auf. Bei *in vitro* Analysen mit rekombinanten Proteinen muss natürlich immer in Betracht gezogen werden, dass die exprimierten Proteine nicht korrekt gefaltet sind und daher in ihrer biologischen Aktivität beeinträchtigt sind. Allerdings haben auch Untersuchungen in eukaryotischen Zellen über Immunpräzipitationen bisher keinerlei Assoziation von Raver1 und Raver2 mit RNA zeigen können (Dissertation B. Henneberg, 2006). Es ist daher ebenso denkbar, dass die rekombinanten Raver-Proteine zwar korrekt gefaltet vorliegen, aber in einer Konformation, die keine Bindung der RRM-Domänen an RNA erlaubt. Da über eventuelle Konformations-bedingte regulatorische Mechanismen bei Raver-Proteinen bisher keine Erkenntnisse vorlagen, wurde ein möglicher inhibitorischer Einfluss der C-terminalen Bereiche auf die RRM-Domänen von Raver1 und Raver2 anhand von chimären Fusionsproteinen untersucht (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Messerschmidt und PD Dr. S. Illenberger). Diese Chimären bestehen aus den N-terminalen Bereichen von Raver1 (AS 1-287) und Raver2 (AS 1-238) und umfassen im Wesentlichen nur die RRM-Domänen. An letztere wurde jeweils der C-terminale Bereich des hnRNP C2-Proteins fusioniert (AS 93-253). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über einen N-terminalen His-„tag“. Für den immunochemischen Nachweis enthielten die Konstrukte einen zusätzlichen FLAG-Fusionsanteil (Abbildung 14).

Das aus den Raver1-RRMs und dem hnRNP C2 C-Terminus bestehende Protein wurde als R1C2 bezeichnet, entsprechend sind im so genannten R2C2-Konstrukt die Raver2-RRMs an den C-Terminus von hnRNP C2 fusioniert.

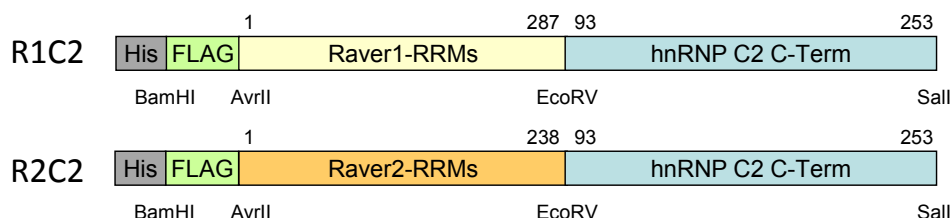


Abbildung 14: Schematische Darstellung chimärer Raver-RRM-Proteine. Die generierten Proteine R1C2 und R2C2 bestehen aus dem N-Terminus von Raver1 (R1C2, gelb) und Raver2 (R2C2, orange), die von einem FLAG-Fusionsanteil (grün) und dem hnRNP C2 C-Terminus (blau) flankiert werden. Zur Aufreinigung der Proteine diente ein N-terminaler His-„tag“ (grau), welcher im verwendeten Expressionsvektor pQE30 integriert war. Die Aminosäure-Positionen der beteiligten Proteine sind oberhalb, die zur Klonierung generierten Restriktionsschnittstellen unterhalb dargestellt.

Beide Proteine wurden in *E.coli* Bakterien exprimiert und sowohl R1C2 (Abbildung 15 B) als auch R2C2 (Abbildung 16 B) ließen sich anschließend über das Ni-NTA-System aufreinigen. Obwohl beide Konstrukte im Immunoblot deutliche Degradationsbanden aufwiesen, konnten sie im RiHoPB-Test eingesetzt werden, da in beiden Präparationen das Gesamtprotein die jeweilige Hauptbande im SDS-Gel darstellte (Daten nicht gezeigt). Parallel zu jedem der im Folgenden dargestellten Versuche wurde als Negativ-Kontrolle das Raver2-Gesamtprotein mit den vier Ribohomopolymeren analysiert. Als Positiv-Kontrolle diente jeweils die Interaktion von PTB mit Uridin-beads (Daten nicht gezeigt; Vergleich zu Abbildung 10).

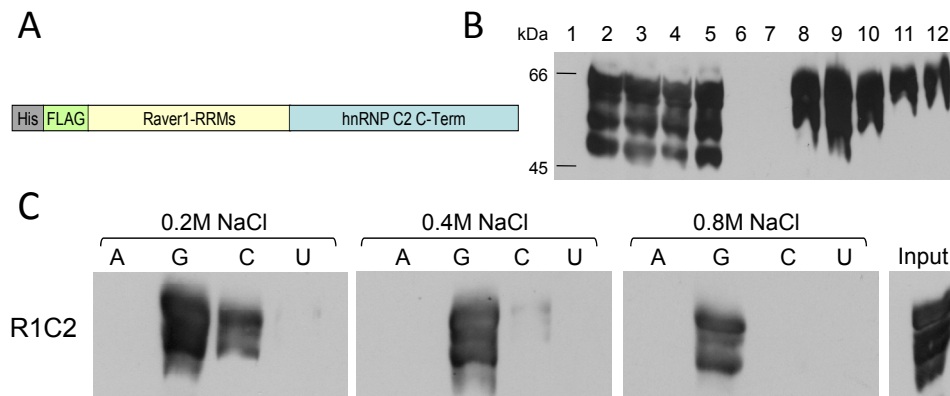


Abbildung 15: Die R1C2-Chimäre bindet an Guanodin-Ribohomopolymere. (A) Schematische Darstellung der verwendeten R1C2-Chimäre. (B) Immunoblot der Ni-NTA-Aufreinigung von R1C2 in ER25566 Bakterien. Die Fraktionen 2-7 zeigen die einzelnen Aufreinigungsschritte und in den Spuren 8-12 sind die Elutionsfraktionen dargestellt (Auftrag entsprechend zu Abbildung 11). Der immunochemische Nachweis des Proteins erfolgte mittels FLAG-Antikörper. (C) Immunoblot-Analysen des RiHoPB-Tests der R1C2-Chimäre. 25 pmol rekombinantes R1C2-Protein wurde mit Poly-A, -G, -C und -U bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,2 M - 0,8 M NaCl) inkubiert und gebundenes Protein mit dem entsprechenden FLAG-Antikörper über das FLAG-„tag“ nachgewiesen.

Der RiHoPB-Test der R1C2-Chimäre zeigte eine Bindung des Proteins an Guanodin- und Cytidin-Agarosen bei 0,2 M NaCl (Abbildung 15 C). Durch Erhöhung der Salzkonzentration kam es zu einer Abnahme der Ribocytidin-Bindung, die Interaktion des Proteins mit Guanodin blieb jedoch bis zu einer Salzkonzentration von 0,8 M NaCl nachweisbar. Daher wurde dieses Signal als spezifische Bindung zwischen der Chimäre und den Agarose-beads gewertet. Da die Bindungsspezifität von R1C2 sich nicht von der des isolierten Raver1-RRM-Konstruktes unterscheidet (siehe Abbildung 11), scheint der C-Terminus von hnRNP C2 somit keinen Einfluss auf die Interaktion der Raver1-RRMs mit RNA zu nehmen.

Ein ähnliches Ergebnis konnte in den RiHoPB-Analysen für die R2C2-Chimäre beobachtet werden (Abbildung 16 C). Auch hier erfolgte die Bindung des Proteins bei geringer Salzkonzentration an Riboguanodin und mit schwächerer Affinität an Ribocytidin. Unter

stringenteren Bedingungen (0,4 M NaCl) war die Interaktion von R2C2 mit den Cytidin-Agarosen kaum noch nachweisbar im Gegensatz zur weiterhin deutlich erkennbaren Bindung an Guanosin. Bei 0,8 M NaCl konnte keinerlei Bindung mehr an Ribohomopolymere nachgewiesen werden.

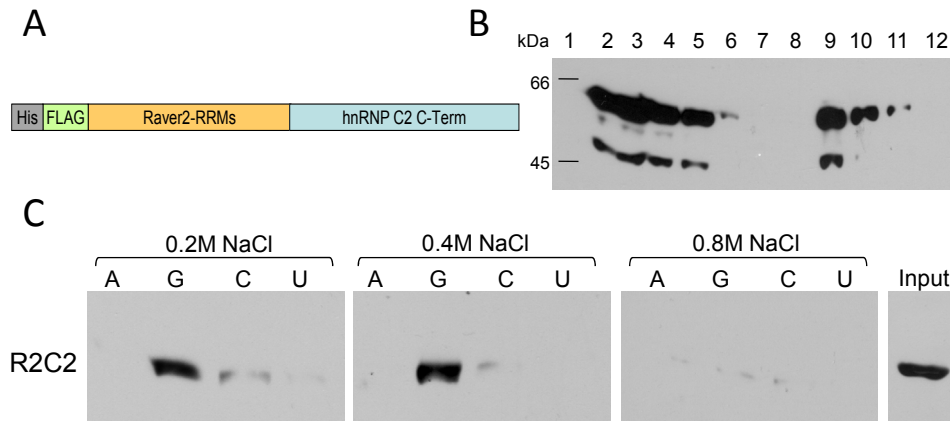


Abbildung 16: Die R2C2-Chimäre weist eine den Raver2-RRMs vergleichbare Bindung an Ribohomopolymere auf. (A) Schematische Darstellung der generierten R2C2-Chimäre. (B) Immunochemischer Nachweis der Ni-NTA-Aufreinigung von R2C2 in ER25566 Bakterien. In den Fraktionen 2-8 sind die aufeinander folgenden Aufreinigungsschritte des Proteins dargestellt. Die Spuren 9-12 zeigen die Elutionen des rekombinanten R2C2-Proteins (Auftrag entsprechend zu Abbildung 11). Der Nachweis des Proteins erfolgte durch den FLAG-Antikörper. (C) Immunoblot-Analysen des RiHoPB-Tests der R2C2-Chimäre. Dabei wurden je 25 pmol R2C2-Protein (Input) mit Poly-A, -G, -C und -U bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0,2 M - 0,8 M NaCl) inkubiert und die Bindung im Immunoblot durch den FLAG-Antikörper detektiert.

Auch diese Ergebnisse sind mit denen vergleichbar, die für das Raver2-RRM-Konstrukt erzielt wurden. Der C-Terminus von hnRNP C2 nimmt keinen Einfluss auf die RRM des Raver2-Proteins bezüglich deren Assoziation mit RNA. Durch die Analysen der chimären Proteine R1C2 und R2C2 konnte somit gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich des hnRNP C2-Proteins nicht inhibierend auf die RNA-Interaktion der Raver-RRMs wirkt. Es stellte sich nun die Frage, ob die Raver-Proteine außerhalb ihrer RRM C-terminale Sequenzabschnitte besitzen, die generell inhibierend auf eine RNA-Interaktion durch entsprechende Bindungsmotive wirken.

Zu diesem Zweck wurden erneut chimäre Fusionsproteine eingesetzt: Die zu R1C2 und R2C2 komplementären C-terminalen Bereiche von Raver1 (AS 288-749) und Raver2 (AS 239-625) wurden jeweils an die N-terminale RRM-Domäne von hnRNP C2 (AS 1-92) fusioniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Messerschmidt und PD Dr. S. Illenberger). Zur Aufreinigung der Proteine über das Ni-NTA-System diente der N-terminale His-„tag“ des pQE30-Expressionsvektors. Für den Nachweis der Proteine im Immunoblot, wurde ebenfalls

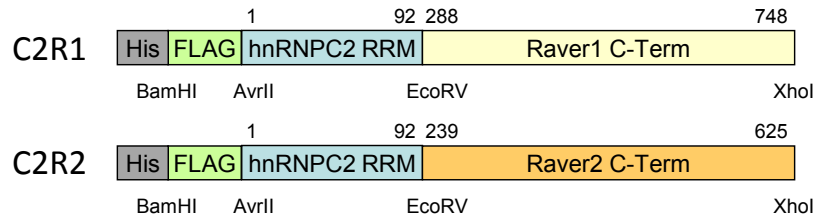


Abbildung 17: Darstellung der chimären Raver-Fusionsproteine C2R1 und C2R2. Der C-Terminus von Raver1 (gelb) und Raver2 (orange) wurde über generierte Restriktionsschnittstellen an die RRM von hnRNP C2 (blau) und einen zusätzlichen FLAG-Fusionsanteil (grün) fusioniert. Zur Aufreinigung der Proteine C2R1 und C2R2 diente ein N-terminaler His-„tag“ (grau). Die Aminosäure-Positionen der Fusionsanteile sind oberhalb, die zur Klonierung generierten Restriktionsschnittstellen unterhalb dargestellt.

N-terminal, ein zusätzlicher FLAG-Fusionsanteil angefügt. Mit diesen Konstrukten (als C2R1 und C2R2 bezeichnet; Abbildung 17), wurde ebenfalls die Bindung an Ribohomopolymere untersucht, um Aufschluss über einen möglichen inhibierenden Einfluss der C-Termini beider Raver-Proteine zu erhalten.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich wird, war es nicht möglich die C2R1-Chimäre im bakteriellen System erfolgreich zu exprimieren und aufzureinigen. Der Immunoblot zeigt zwar das charakteristische Schema einer Proteinaufreinigung, allerdings laufen die Expressionsbanden (Spur 3 und 4) und die Elutionsbanden (Spur 8-10) auf einer Höhe von etwa 15 kDa. Das chimäre Protein sollte jedoch ein apparentes Molekulargewicht von 58 kDa besitzen. Da eine Klonierungs-bedingte Verschiebung des Leserasters unter Einführung eines vorzeitigen Stoppcodons nach DNA-Sequenzierung ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt), erfolgte in den Bakterien möglicherweise ein vorzeitiger Translationsabbruch. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für das Raver1-Gesamtprotein im bakteriellen Expressionssystem beobachtet (Dissertation A. Zieseniss, 2005), so dass möglicherweise die Expression des Raver1 C-Terminus generell in bakteriellen Systemen problematisch ist.

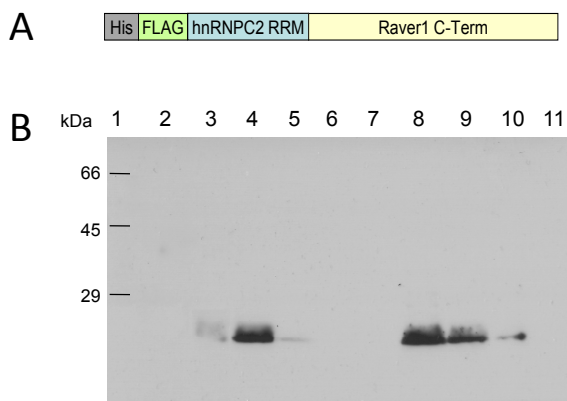


Abbildung 18: Die C2R1-Chimäre lässt sich über ein bakterielles System nicht aufreinigen.

(A) Schematische Darstellung des chimären C2R1-Proteins. (B) Immunoblot der Ni-NTA-Aufreinigung von C2R1. Die Fraktionen 1-6 stellen die verschiedenen Aufreinigungsschritte dar. Die Proben 8-11 zeigen die Elution eines 15 kDa Proteins, das lediglich einem N-terminalen Fragment der 58 kDa Chimäre C2R1 entspricht, welches sich durch den FLAG-Antikörper immunochemisch nachweisen lässt.

Eine Expression der C2R1-Chimäre in Insektenzellen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, so dass auf weitere Analysen dieser Chimäre verzichtet wurde. Die Expression der C2R2-Chimäre in ER2566-Bakterien hingegen war erfolgreich und das Protein konnte über das Ni-NTA-Agarose-System aufgereinigt werden (Abbildung 19 B).

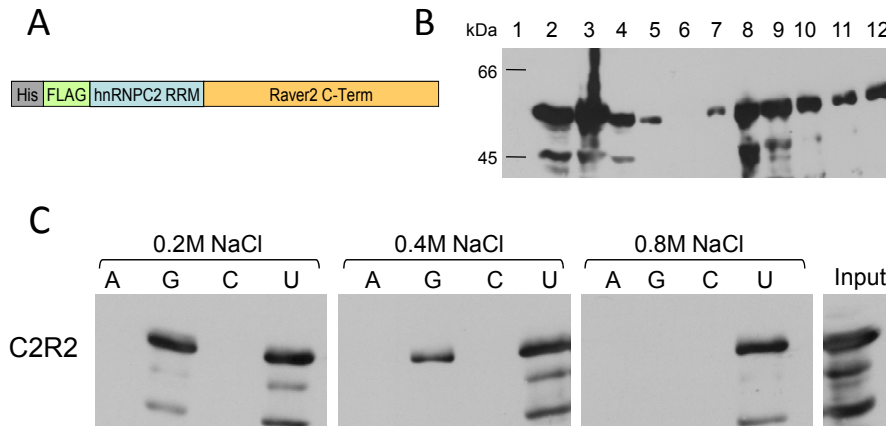


Abbildung 19: Die C2R2-Chimäre zeigt eine erhöhte Präferenz für Uridin-Ribohomopolymere im Vergleich zum hnRNP C2. (A) Vereinfachte Abbildung der C2R2-Chimäre. Der in (B) dargestellte Immunoblot zeigt die rekombinante Aufreinigung von C2R2 (Vergleich zu Abbildung 11), wobei der Nachweis des Proteins im Immunoblot über den FLAG-Antikörper erfolgte. Die vier verschiedenen Ribohomopolymer-beads wurden in (C) mit je 25 pmol rekombinantem C2R2-Protein (Input) inkubiert. Der FLAG-Antikörper diente zum Nachweis des Proteins im Immunoblot.

Wie das komplementäre Konstrukt R2C2 zuvor wurde auch die C2R2-Chimäre mittels RiHoPB-Test auf eine potentielle RNA-Interaktion hin analysiert. Abbildung 19 C zeigt den Immunoblot der RiHoPB-Analysen. Die C2R2-Chimäre bindet demnach unter allen verwendeten Bedingungen an Ribouridin-Agarose. Im Gegensatz dazu nimmt die Interaktion der Chimäre mit Guanosin bei steigender Salzkonzentration ab und ist bei 0,8 M NaCl nicht mehr nachweisbar. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Analysen des hnRNP C2-Gesamtproteins (siehe Abbildung 10), so ist eine leichte Verschiebung in der Bindungspräferenz zu erkennen. Während hnRNP C2 unter allen getesteten Salzbedingungen mit PolyG- und PolyU-beads präzipitiert werden konnte, wurde für die C2R2-Chimäre mit steigender Salzkonzentration eine zunehmende Präferenz für Poly-Uridin nachgewiesen. Der C-terminale Bereich des Raver2-Proteins übt somit *in vitro* einen leicht modulierenden Einfluss auf das Bindungsverhalten der singulären RRM von hnRNP C2 aus. Die Nicht-Bindung von Raver2-Gesamtprotein lässt sich hierdurch jedoch nicht erklären.

Die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen zur Bindung von Raver-Proteinen an RNA haben insgesamt ergeben, dass die auf Sequenzanalysen basierend eingestuft RRM-Bereiche als isolierte Domänen tatsächlich in der Lage sind, an RNA zu binden. Es bleibt jedoch weiterhin

zu klären, weshalb dennoch keine RNA-Bindung durch die Raver-Gesamtproteine erfolgt (siehe Diskussion Kapitel 4.1).

3.2 Charakterisierung der Raver1/Raver2-PTB Interaktion

Auf Grund der bisherigen Datenlage muss davon ausgegangen werden, dass Raver-Proteine über ihre RRM's prinzipiell in der Lage sind RNA zu binden, auch wenn es bisher keine experimentellen Daten gibt, die diese direkte Assoziation für die Gesamtproteine nachweisen. Allerdings können beide Raver-Proteine über ihren Liganden PTB an RNA rekrutiert werden (Dissertation B. Henneberg, 2006; Rideau et al., 2006).

In Abbildung 20 ist die Interaktion von Raver1 mit PTB an RNA in trimeren Komplexen im RiHoPB-Test dargestellt. Raver1 wurde dazu jeweils mit PTB und den vier entsprechenden Ribohomopolymer-Agarosen eine Stunde inkubiert und dann die Agarose mittels Zentrifugation sedimentiert. Die Sedimente wurden im Immunoblot mittels FLAG Antikörper für Raver1 und BB7 Antikörper für PTB analysiert. Unter geringen Salzkonzentrationen (0,2 M NaCl) bindet PTB wie erwartet an fast alle Ribohomopolymere mit Ausnahme von Riboadenosin. Raver1 wird dabei durch die Bindung an PTB co-präzipitiert. Unter stringenten Salzbedingungen (0,8 M NaCl) sind die präzipitierten Raver1-PTB-Komplexe nur noch in der PolyU-Probe nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Daten überein (Dissertation B. Henneberg, 2006).

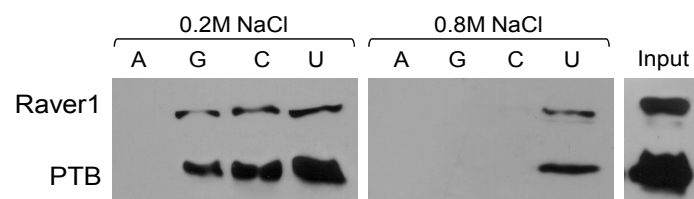


Abbildung 20: Raver1 kann über die Bindung an PTB in trimeren Komplexen mit Ribohomopolymeren co-präzipitiert werden. RiHoPB-Test von Raver1 in Anwesenheit von PTB. Es wurden jeweils 25 pmol rekombinantes Raver1 und PTB-Protein (Input) mit den Ribohomopolymer-Agarosen (Riboadenosin- (A), Riboguanosin- (G), Ribocytidin- (C) und Ribouridin-Agarosen (U)) inkubiert. Zur Erhöhung der Stringenz wurden verschiedene Salzkonzentrationen verwendet (0,2 M – 0,8 M NaCl). Der Nachweis von präzipitiertem Protein erfolgte im Immunoblot durch den monoklonalen FLAG Antikörper für Raver1 und den BB7 Antikörper für PTB.

Über eine *in vitro* Analyse verschiedener Deletionskonstrukte und Peptide wurden 2006 vier potentielle Bindungsmotive identifiziert, über die prinzipiell eine Assoziation von Raver1 an PTB erfolgen kann. Die daraus abgeleitete Konsensus-Sequenz [S/G][L/I]LGxxP scheint

hierbei charakteristisch für eine Interaktion mit der RRM2 von PTB zu sein (Rideau et al., 2006). Im Folgenden wurde untersucht, ob im Raver1-Gesamtprotein tatsächlich alle vier Motive auch für die Bindung an PTB verantwortlich sind.

3.2.1 Subzelluläre Lokalisation der PTB-Bindungsmutanten in Raver1

In Analogie zu den Untersuchungen von Rideau et al. (2006) wurden Mutationen in die PTB-Bindungsmotive von Raver1 eingefügt. Hierbei wurden jeweils zwei für die Peptidbindung essentielle Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht. Diese Mutationen hatten *in vitro* eine drastische Reduktion der Bindung von Peptiden an PTB hervorgerufen (Rideau et al., 2006). In Abbildung 21 sind die Positionen der vier Bindungsmotive schematisch in einem Raver1-Diagramm dargestellt. Aus den darunter befindlichen Sequenzabschnitten, welche die vier Bindungsmotive beinhalten, lässt sich die Konsensus-Sequenz [S/G][L/I]LGxxP ermitteln. Die substituierten Aminosäuren sind rot hervorgehoben, die hierfür eingefügten Alanine sind in der Sequenz grün gekennzeichnet. Zunächst wurden vier Einzelmутanten generiert (M1-M4), in denen jeweils nur das entsprechende Bindungsmotiv mutiert worden war. In weiteren Klonierungsschritten wurden zwei so genannte Doppelmутanten erzeugt, die entweder eine Mutation in beiden N-terminalen Sequenzmotiven (M1-2) oder beiden C-terminalen Sequenzmotiven (M3-4) beinhalten. Alle Mutanten wurden freundlicherweise von Dr. B. Henneberg zur Verfügung gestellt.

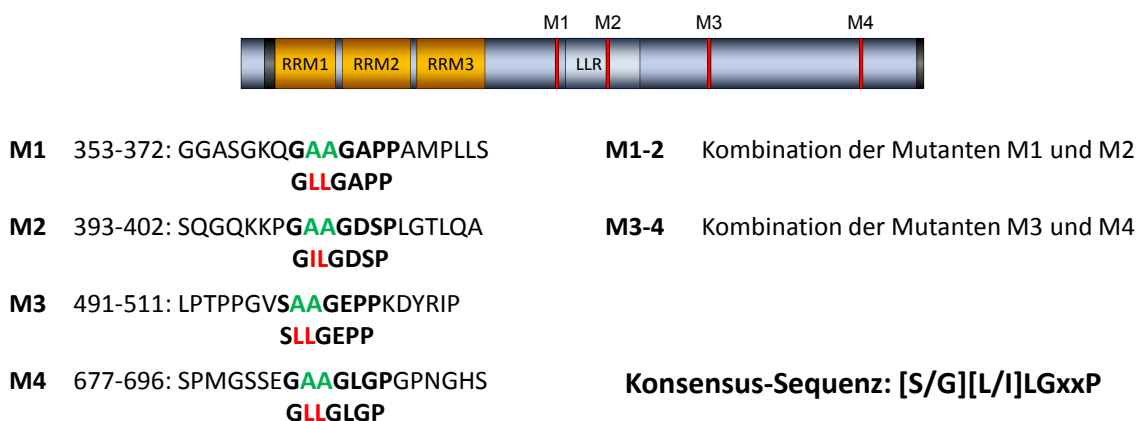


Abbildung 21: Darstellung der generierten PTB-Bindungsmutanten im Raver1-Protein. Die Positionen der vier PTB-Bindungsmotive des Raver1-Proteins sind als rote Balken (M1-M4) in der schematischen Raver1-Abbildung dargestellt. Jede Einzel-Mutante (links) wurde durch Substitution der zentralen zwei Aminosäuren im Bindungsmotiv generiert. Die substituierten Aminosäuren (rot) wurden durch Alanine ersetzt (grün). Aus diesen Einzel-Mutanten wurden Doppelmутanten erstellt, in denen je zwei PTB-Bindungsmotive mutiert sind (rechts). Alle PTB-Bindungsmotive in Raver1 entsprechen der Konsensus-Sequenz: [S/G][L/I]LGxxP (modifiziert nach Rideau et al., 2006)

Eine Möglichkeit zur Analyse der PTB-Bindungsmutanten von Raver1 in einem zellulären Kontext bietet die Co-Lokalisation mit PTB in Zellen. Wie bereits beschrieben, lokalisieren PTB und Raver1 gemeinsam im Zellkern und liegen dabei konzentriert in Nucleoli-assoziierten Strukturen (PNCs = „perinucleolar compartments“) vor (Hüttelmaier et al., 2001; Rideau et al., 2006), die vor allem durch eine Akkumulation von PTB charakterisiert sind (Huang et al., 1998). Es besteht zudem die Hypothese, dass Raver1 über Bindung an PTB in diese Strukturen rekrutiert wird (Dissertation B. Henneberg, 2006). Für die Co-Lokalisationsstudien dieser Arbeit wurden Raver1-Wildtyp, sowie alle sechs in Abbildung 21 dargestellten Mutanten als Fusionsproteine mit N-terminalem „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) in HeLa-Zellen exprimiert. Durch Gegenfärbung von endogenem PTB mit einem spezifischen Antikörper (BB7) konnte nun eine Rekrutierung der Raver-Konstrukte in zelluläre PNCs analysiert werden. Diese Arbeiten wurden in Kollaboration mit Dr. B. Henneberg durchgeführt.

In Abbildung 22 sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen für alle Raver1-Proteine dargestellt. Die erste Spalte zeigt das jeweilige transfizierte GFP-Konstrukt. In der zweiten Spalte ist die jeweilige Gegenfärbung für endogenes PTB dargestellt. Die über die Fluoreszenzaufnahmen identifizierten Positionen der PNCs sind durch Pfeile hervorgehoben. In der Übereinanderlagerung („Merge“) ist eine Co-Lokalisation von PTB mit den Raver1-Proteinen anhand einer gelben Färbung erkennbar. Die beiden rechten Spalten zeigen die Darstellung der Zellkerne durch DAPI-Färbung sowie den gesamten Ausschnitt im Phasenkontrast. In den jeweiligen PTB-Immunfluoreszenzen der Abbildung 22 sind die PNCs deutlich zu erkennen. Die meisten der untersuchten Raver1-Konstrukte werden ebenfalls in diese Strukturen rekrutiert. Lediglich die Mutante M3 zeigte keine klare Akkumulation in PNCs. Auch bei der Doppelmutante M3-4 war keine entsprechende Anhäufung in diesen Kernstrukturen zu erkennen.

Die parallel zu diesen Untersuchungen durchgeführten Kontrollen sind in Abbildung 23 in gleicher Weise dargestellt. Als Positiv-Kontrolle wurde PTB ebenfalls als EGFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen exprimiert (obere Reihe) und weist eine deutliche Co-Lokalisation mit seinem endogenen Pendant in PNCs auf. Somit verhält sich transfiziertes EGFP-PTB genau wie endogenes PTB und kann mit diesem um zelluläre Bindungspartner konkurrieren. Der Versuchsansatz zeigt außerdem, dass der EGFP-Fusionsanteil keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung oder die Ausbildung von PNCs durch PTB hat. Keine Rekrutierung in die PNCs konnte für hnRNP C2 nachgewiesen werden, welches diffus im Nucleoplasma verteilt ist (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1992) und somit als Negativ-Kontrolle

fungierte. Durch eine solche Kontrolle wurde ausgeschlossen, dass es sich bei den als PNCs identifizierten Strukturen um Aggregate in Folge einer GFP Überexpression handelte.

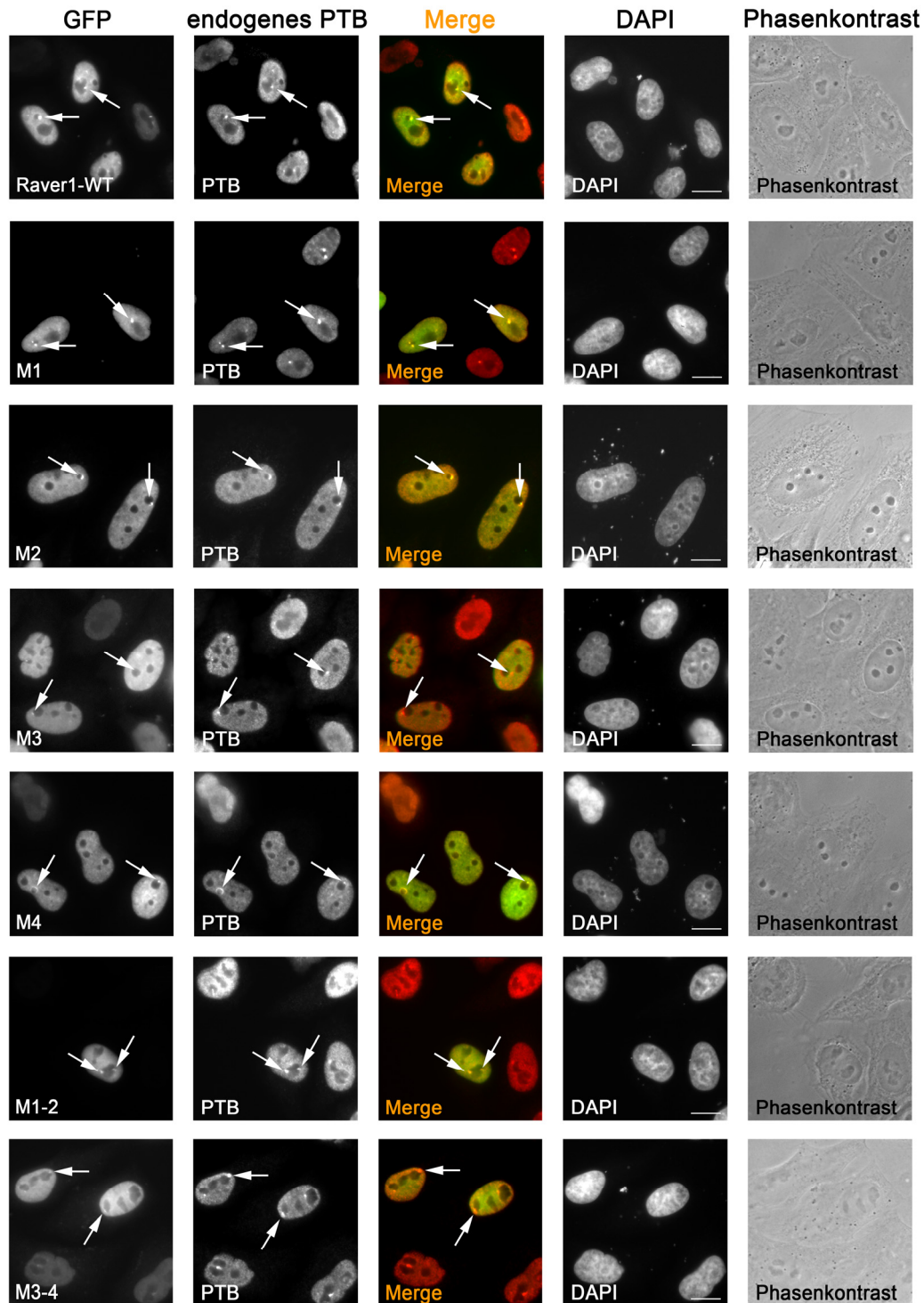


Abbildung 22: Die PTB Bindungsmutante M3 des Raver1-Proteins co-lokalisiert nicht mit PTB in den „perinucleolar compartments“ (PNCs). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EGFP-Raver1-Konstrukten in transfizierten HeLa-Zellen (Spalte 1). Zum Nachweis des endogenen PTB-Proteins wurden der monoklonale BB7 Antikörper und ein TRITC-gekoppelter Zweitantikörper verwendet (Spalte 2). In der Überlagerung (Merge) konnten Co-Lokalisationen beider Proteine im Zellkern ermittelt werden. Die Pfeile weisen auf die PNCs hin, anhand derer die Co-Lokalisation der Raver1-Proteine und PTB untersucht werden sollte. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt (Spalte 4). Die Morphologie der HeLa-Zellen ist durch den Phasenkontrast ersichtlich (Spalte 5). Die Balken entsprechen 10 µm.

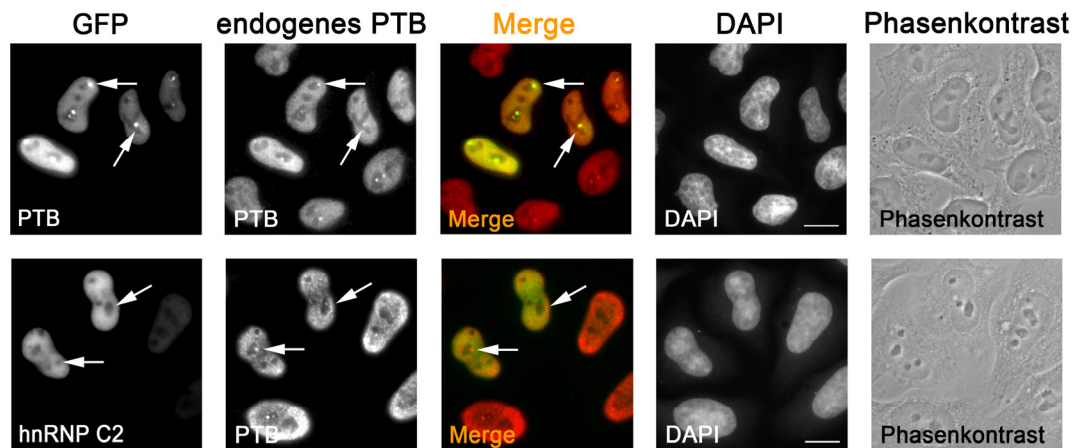


Abbildung 23: Der EGFP-Fusionsanteil nimmt keinen Einfluss auf die Ausbildung von PNCs in HeLa-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EGFP-PTB und EGFP-hnRNP C2 in transfizierten HeLa-Zellen (Spalte 1). Als Vergleich wurde endogenes PTB durch den BB7 Antikörper und einen TRITC-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen (Spalte 2) und mit dem transfizierten Protein in der Übereinanderlagerung (Merge) verglichen. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt (Spalte 4). Die Morphologie der HeLa-Zellen ist durch den Phasenkontrast ersichtlich (Spalte 5). Der Balken entspricht jeweils 10 µm.

Die quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 24 dargestellt. Zunächst wurde für PTB und alle Raver1-Konstrukte der Anteil an transfizierten HeLa-Zellen bestimmt, die in der Immunfluoreszenzdarstellung für endogenes PTB deutliche PNCs aufwiesen. Hierfür wurden für jedes Konstrukt insgesamt dreihundert transfizierte Zellen in drei unabhängigen Versuchsansätzen (je einhundert pro Ansatz) analysiert und aus dem Mittelwert der jeweilige prozentuale Anteil PNC-haltiger Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass zwischen 80-90% aller transfizierten HeLa-Zellen in der PTB-Färbung PNCs aufwiesen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Überexpression der Konstrukte die Ausbildung endogener PNCs negativ beeinflusst.

Parallel zu der generellen Erfassung des Auftretens von PNCs wurde in denselben Zellen auch analysiert, ob das jeweilige GFP-Konstrukt in den PNCs mit endogenem PTB co-lokalisiert war. Für die Ermittlung des jeweiligen prozentualen Anteils wurden die transfizierten Zellen = 100% gesetzt. Für die Positiv-Kontrolle von PTB bedeutet dies beispielsweise, dass im Durchschnitt 90 von 100 transfizierten Zellen PNCs aufwiesen (Abbildung 24 A). Von diesen 90 Zellen zeigten 98% eine Co-Lokalisation von EGFP-PTB mit endogenem PTB (Abbildung 24 B). Vergleicht man nun die einzelnen Raver1-Konstrukte, die alle zu annähernd gleichen Anteilen in PNC bildenden Zellen exprimiert wurden, so bestätigt sich in der quantitativen Analyse der durch die optische Auswertung (Abbildung 22) gewonnene Eindruck, dass während die meisten Konstrukte zu über 90% in

PNCs akkumuliert vorlagen, die Mutante M3 (29%) sowie die Doppelmutante M3-4 (28%) eine signifikant niedrigere Präsenz in PNCs zeigten (Abbildung 24 B).

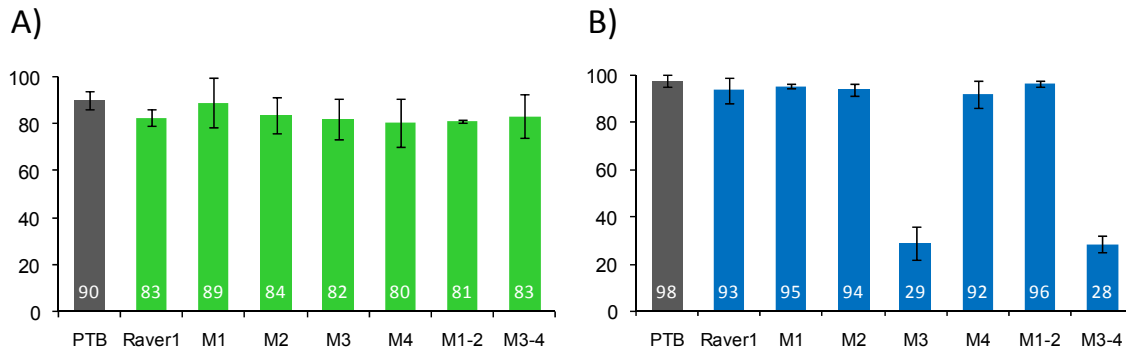


Abbildung 24: Die reduzierte Lokalisation der Raver1 M3-Mutante in den PNCs ist nicht Konstrukt-abhängig. Quantifizierung der PNCs in transfizierten HeLa-Zellen aus drei unterschiedlichen Versuchsreihen (A). Die Auszählung erfolgte durch den Nachweis von endogenem PTB mittels BB7 Antikörper. (B) Quantifizierung der PNCs, in denen EGFP-Raver1-Konstrukte mit endogenem PTB colokalisieren. Der Nachweis der Raver1-Konstrukte erfolgte über den GFP-Fusionsanteil. Unter den Diagrammen sind die jeweils transfizierten Konstrukte aufgelistet. Die Standardabweichung aus den drei durchgeführten Versuchsreihen ist in den Balken gekennzeichnet. Die Zahlen geben jeweils die berechneten Mittelwerte an.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analysen wird somit deutlich, dass dem Bindungsmotiv 3 eine besondere Rolle bei der Rekrutierung des Raver1-Proteins in PNCs zukommt. Eine direkte Beteiligung an der Interaktion mit PTB erscheint auch im Bezug auf die *in vitro* Daten von Rideau et al. (2006) wahrscheinlich. Eine Überprüfung dieser Hypothese in biochemischen Analysen war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die Raver1-Mutanten entsprechend dem Wildtyp-Protein nicht bakteriell exprimiert werden konnten und ein auf Insektenzellen basierendes Expressionssystem nicht zeitnah zur Verfügung stand. Um dennoch eine mögliche Beteiligung des SLLG-Motivs an einer direkten Interaktion mit PTB auch biochemisch zeigen zu können, wurden Analysen an rekombinantem Raver2-Protein durchgeführt, das ebenfalls zwei potentielle PTB-Bindungsmotive aufweist, von denen ein Motiv zu dem SLLG-Motiv von Raver1 identisch ist (Abbildung 25).

3.2.2 Analyse von PTB-Bindungsmutanten im Raver2-Protein

Der C-terminale Bereich von Raver2 weist zwei Sequenzmotive auf, die der von Rideau et al. (2006) ermittelten Konsensus-Sequenz entsprechen. Für beide Sequenzmotive wurden in gleicher Weise, wie bereits für Raver1 beschrieben, Mutanten hergestellt, in denen die beiden Leucine durch Alanine ersetzt wurden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. S. Illenberger). Das Konstrukt, welches eine Mutation im ersten Sequenzmotiv beinhaltetete, wurde als R2-GAAG bezeichnet, die Alanin-Mutante des zweiten Motivs wurde R2-SAAG genannt. Letzteres Sequenzmotiv stimmt mit dem für die PTB-Bindung relevanten Peptidmotiv (M3) in Raver1 überein. Aus der Kombination beider Einzelmутanten wurde die Doppelmutante R2-DoMut generiert.

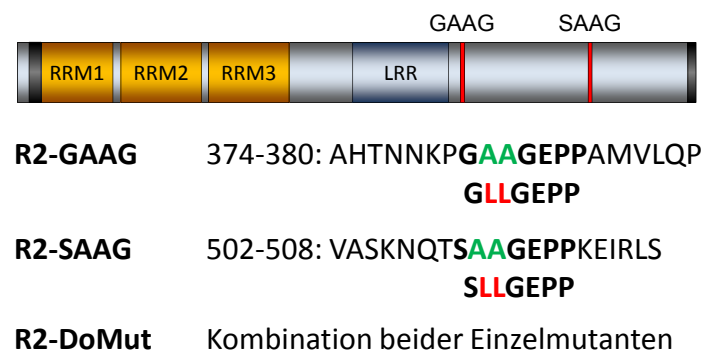


Abbildung 25: Darstellung der generierten PTB-Bindungsmutanten im Raver2-Protein. Die durch Mutagenese erzeugten Aminosäure-Substitutionen in beiden potentiellen PTB-Bindungsmotiven des Raver2-Proteins sind als rote Balken im oberen Raver2-Schema dargestellt (GAAG und SAAG). Die substituierten Aminosäuren (rot) wurden durch Alanine ersetzt (grün). Aus beiden Einzel-Mutanten (R2-GAAG und R2-SAAG) wurde eine Doppelmutante (R2-DoMut) generiert, in der beide PTB-Bindungsmotive mutiert sind. Alle PTB-Bindungsmotive in Raver2 entsprechen der Konsensus-Sequenz: [S/G][L/I]LGxxP des Raver1-Proteins (Rideau et al., 2006).

Diese drei Raver2-Mutanten wurden zeitgleich zu der vorliegenden Arbeit als EGFP-Konstrukte im Rahmen einer Diplomarbeit auf ihre zelluläre Lokalisation hin überprüft (Diplomarbeit S. Becke, 2007). Sowohl Raver2-Wildtyp als auch die Mutanten lokalisierten dabei im Kern. In Co-Lokalisationsstudien mit endogenem PTB und entsprechender Quantifizierung der Raver2-Konstrukte im Vergleich zu EGFP, die unter gleichen Bedingungen wie für Raver1 und dessen Mutanten durchgeführt wurden (Kapitel 3.2.1), zeigten Raver2 und die R2-GAAG-Mutante eine ähnlich effiziente Rekrutierung in die PNCs wie EGFP-PTB. Im Gegensatz dazu war die Rekrutierung in PNCs für die R2-SAAG-Mutante und R2-DoMut drastisch reduziert. Diese Daten stimmen insofern exakt mit den Ergebnissen für Raver1 überein, als dass lediglich das zu M3 in Raver1 identische zweite

Bindungsmotiv (R2-SAAG) für eine Akkumulation von Raver2 in PNCs verantwortlich zu sein scheint. Auf Grund der hohen Übereinstimmung aller bisherigen Daten für Raver1 und Raver2 war daher anzunehmen, dass über die *in vitro* Analyse von Raver2 auch indirekt Rückschlüsse auf Raver1 gezogen werden könnten. Um die Bindung von Raver2 und den Bindungsmutanten *in vitro* nicht nur prinzipiell darzustellen, sondern gleichzeitig auch quantifizieren zu können, sollten *in vitro* translatierte, radioaktiv markierte Raver2-Konstrukte mit Hilfe von rekombinantem PTB in so genannten GST-„Pulldown“-Experimenten auf ihre Bindung an PTB getestet werden. Die für einen solchen Assay erforderlichen Fusionsproteine aus PTB und Glutathion-S-Transferase wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit generiert und beschrieben (Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005). Zunächst wurden zwei PTB-Konstrukte, welche sich durch einen N-terminalen (GST-PTB) beziehungsweise C-terminalen GST-Fusionsanteil (PTB-GST) unterscheiden, vergleichend in *E.coli* exprimiert und anschließend über Glutathion-Agarose aufgereinigt (Kapitel 2.4.4.3). Abbildung 26 zeigt die immunochemische Analyse beider Aufreinigungen, in der die PTB-Fusionsproteine durch den GST-spezifischen Antikörper G1417 nachgewiesen wurden. Beide PTB-Konstrukte konnten erfolgreich isoliert werden, wiesen allerdings noch deutliche Degradationsbanden auf. Auf Grund der höheren Expression und Ausbeute des PTB-Konstrukts mit N-terminalem GST-Fusionsanteil (Abbildung 26 A) wurde dieses GST-PTB-Konstrukt für die weiteren Analysen ausgewählt.

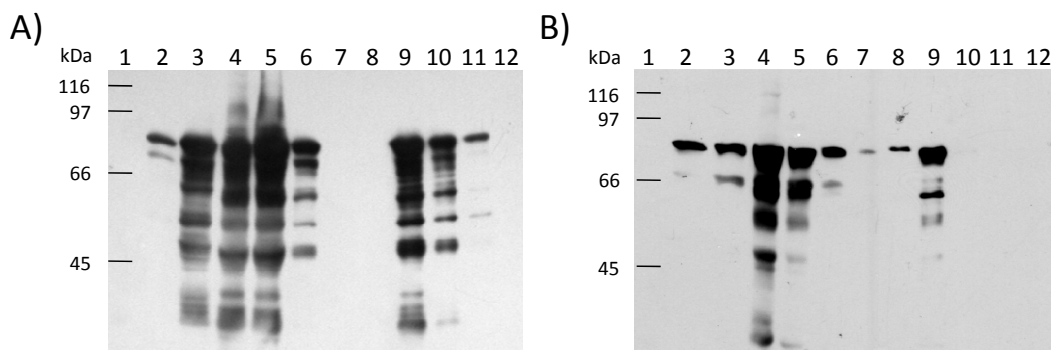


Abbildung 26: Darstellung der rekombinanten Expression und Aufreinigung von PTB-Fusionsproteinen. Immunoblots der Proteinaufreinigungen von PTB mit N-terminalem GST-Fusionsanteil (A) und C-terminalem GST-Epitop-„tag“ (B). Der immunochemische Nachweis beider Fusionsproteine erfolgte durch den α -GST-Antikörper (G1417, Sigma-Aldrich). In beiden Immunoblots wurden die Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte wie folgt aufgetragen: (1) Proteingrößenstandard „High molecular weight marker“, (2) Bakteriensuspension vor Induktion, (3) Bakteriensuspension nach Induktion, (4) Überstand des Bakterienextraktes nach Zentrifugation, (5) Überstand des Bakterienextraktes nach Inkubation mit Glutathion Sepharose 4 Fast Flow, (6) Waschfraktion Lysispuffer, (7) Waschfraktion Waschpuffer, (9) Waschfraktion Elutionspuffer, (9-12) Protein-Elutionsfraktionen.

Da Degradationsprodukte, welche den GST-Fusionsanteil beinhalten, die Effizienz von „Pull-down“-Experimenten stark beeinträchtigen können, wurde das GST-PTB-Konstrukt einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen, der vor allem sicherstellen sollte, dass nur intaktes und RNA-bindungskompetentes PTB-Protein in der Probe enthalten war. Zu diesem Zweck wurde die GST-PTB Präparation mit Oligo(dT) Cellulose-beads inkubiert (Kapitel 2.4.4.4). Da lediglich korrekt gefaltetes PTB an diese beads binden kann, wurden über diesen Aufreinigungsschritt alle möglichen Degradationsprodukte sowie Kontaminationen durch bakterielle Proteine eliminiert.

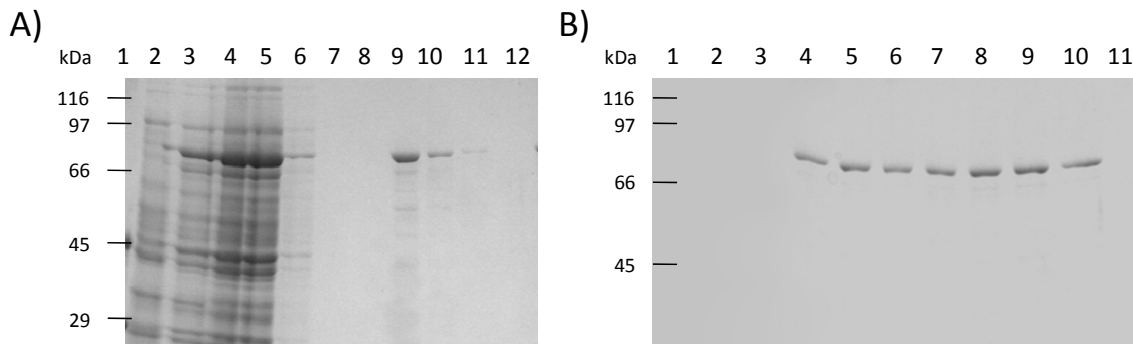


Abbildung 27: Funktionelle GST-PTB-Aufreinigung durch Oligo (dT) Cellulose-beads. Coomassie-Brilliantblau-Färbung der PTB-Aufreinigung mit N-terminalem GST-Fusionsanteil vor (A) und nach der Reinigung (B) mit Oligo(dT) Cellulose Type 7 (Amersham). Das Auftragsschema des in A gezeigten Coomassie-Brilliantblau gefärbten Polyacrylamid-Gels entspricht demjenigen der Abbildung 26. In Abbildung B sind die Elutionsfraktionen des gereinigten GST-PTB-Proteins wie folgt dargestellt: (1) Proteingrößenstandard „High molecular weight marker“, (2-3) Elution mit 200 mM KCl, (4-5) Elution mit 400 mM KCl, (6-7) Elution mit 600 mM KCl, (8-9) Elution mit 800 mM KCl, (10-11) Elution mit 1 M KCl.

Eine vergleichende Analyse vor und nach der Behandlung mit Oligo(dT) Cellulose-beads ist in Abbildung 27 gezeigt. Konventionell aufgereinigtes GST-PTB zeigt in der dargestellten Coomassie-Brilliantblau-Färbung wie zuvor im Immunoblot einen deutlichen Anteil an Degradationsbanden (Abbildung 27 A, Spuren 9-12). Nach der Reinigung des PTB-Proteins mittels Oligo(dT) Cellulose-beads konnte für die Elutionsfraktionen 4-10 lediglich eine Bande auf Höhe des intakten Proteins bei etwa 83 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 27 B). Das so affinitätsgereinigte GST-PTB-Protein konnte anschließend für Interaktionsstudien mit Raver2-Konstrukten verwendet werden.

Zunächst wurde das GST-PTB-Protein vergleichend mit dem in vorangegangenen Analysen verwendeten FLAG-PTB-Konstrukt im so genannten „Dot-Overlay“ analysiert (Abbildung 28). Je 25 pmol beider PTB-Proteine wurden auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und anschließend mit den *in vitro* translatierten Raver2-Proteinen inkubiert. Die Raver2-Konstrukte zeigten dabei keine Unterschiede hinsichtlich ihrer *in vitro*

Translationsrate (Abbildung 28 A). Als Negativ-Kontrolle wurden zusätzlich 25 pmol BSA aufgebracht. In Abbildung 28 B sind die Autoradiografien der vier parallelen Versuchsansätze gezeigt. Während Raver2-Wildtyp ein deutliches Signal vergleichbarer Intensität für beide PTB-Konstrukte aufweist, konnte keine unspezifische Bindung an BSA nachgewiesen werden. Auch die Raver2-Bindungsmutanten zeigen lediglich eine Assoziation an PTB, nicht aber an BSA. Allerdings ist eine deutliche Abnahme der Signalintensitäten gegenüber dem Wildtyp-Protein zu verzeichnen.

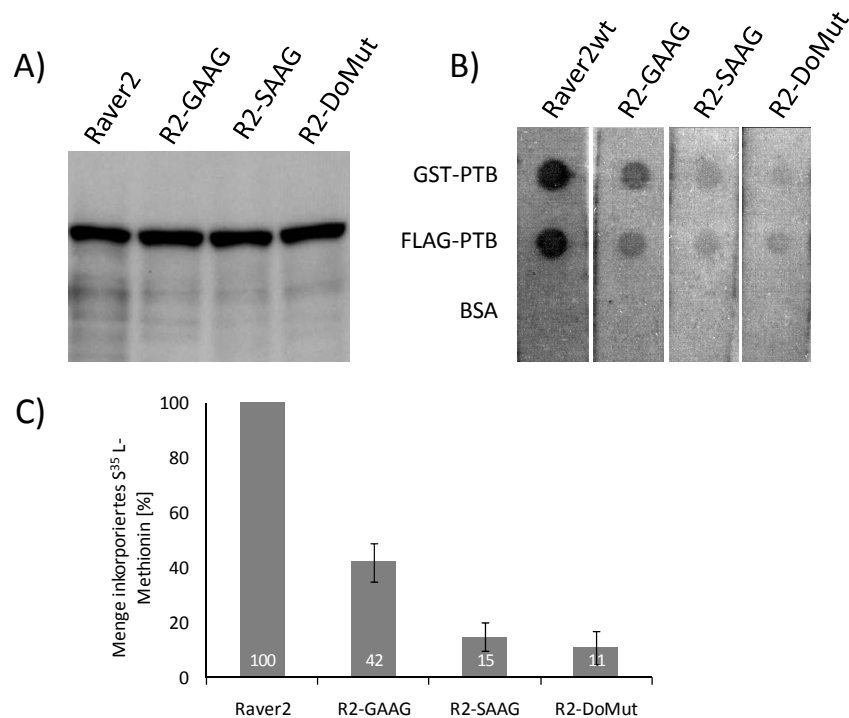


Abbildung 28: Die PTB-Bindungsmotive im Raver2-Protein sind essentiell für die Interaktion mit PTB. Radioaktiver „Dot-Overlay“ mit *in vitro* translatierten Raver2-Konstrukten. A) Je 2 µl des jeweiligen *in vitro* Translationsansatzes wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie. B) Rekombinantes GST-PTB, FLAG-PTB und BSA wurden mit 25 pmol/Spot auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Je 12,5 µl der *in vitro* translatierten Raver2-Konstrukte wurden für 3 h mit den Nitrozellulose-Membranen inkubiert und anschließend gebundenes Protein durch Autoradiographie nachgewiesen. C) Mittels Cerenkov-Zählung konnte die Inkorporation der Radioaktivität auf den einzelnen Membran-Abschnitten gemessen werden. Die gemessene Radioaktivität wurde für PTB =100% gesetzt und die Werte der Raver2-Proteine relativ zu diesem Wert berechnet. Die ermittelten Relationen sind im Balkendiagramm dargestellt.

Die Mittelwerte, der durch Cerenkov-Zählung ermittelten Quantifizierungen (Abbildung 28 C) von drei unabhängigen Versuchen ergab, dass die relative Signalintensität für R2-GAAG 43% des für den Wildtyp gemessenen Wertes betrug (100%). Für die Mutanten R2-SAAG (15%) und R2-DoMut (11%) konnte hingegen nur eine sehr geringe Bindung an

PTB festgestellt werden. Somit scheinen für Raver2 beide Mutanten die Interaktion mit PTB zu schwächen, wobei der Effekt einer Mutation im Motiv 2 (R2-SAAG) deutlich stärker ist. Die Immobilisierung eines Interaktionspartners kann kritisch betrachtet problematisch sein, da es zu einer Denaturierung des immobilisierten Proteins kommen kann. Außerdem kann die hohe lokale Akkumulation von immobilisierten Proteinen unspezifische Bindungen begünstigen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich GST-„Pulldown“-Experimente durchgeführt (Kapitel 2.4.10), in denen beide Interaktionspartner in Lösung vorlagen. Dabei wurde zunächst das GST-PTB-Protein an Glutathion-Sepharose-beads gebunden und mit *in vitro* translatierten Raver2-Konstrukten inkubiert. Durch Sedimentation über die Glutathion-Sepharose-beads werden in diesem Assay nur die Proteine co-präzipitiert, die an das GST-Fusionsprotein binden. Dadurch treten unspezifische Assoziationen deutlich seltener als im „Dot-Overlay“ auf.

Die *in vitro* translatierten Raver2-Konstrukte zeigten dabei keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Translationsrate (Abbildung 29 A). In den vergleichenden „Pulldown“-Analysen der Abbildung 29 B wurde jedoch lediglich für Raver2-Wildtyp eine deutliche Bindung an GST-PTB nachgewiesen. Eine schwache Interaktion zeigte zudem die R2-GAAG-Mutante mit GST-PTB. Die R2-SAAG-Mutante und R2-DoMut konnte hingegen nicht mit GST-PTB co-präzipitiert werden. Die verwendeten Negativ-Kontrollen, in denen GST anstatt des GST-PTB-Proteins verwendet wurde, zeigten keine Interaktion mit den *in vitro* translatierten Raver2-Konstrukten. Trotz marginaler Unterschiede zwischen „Pulldown“-Experimenten und

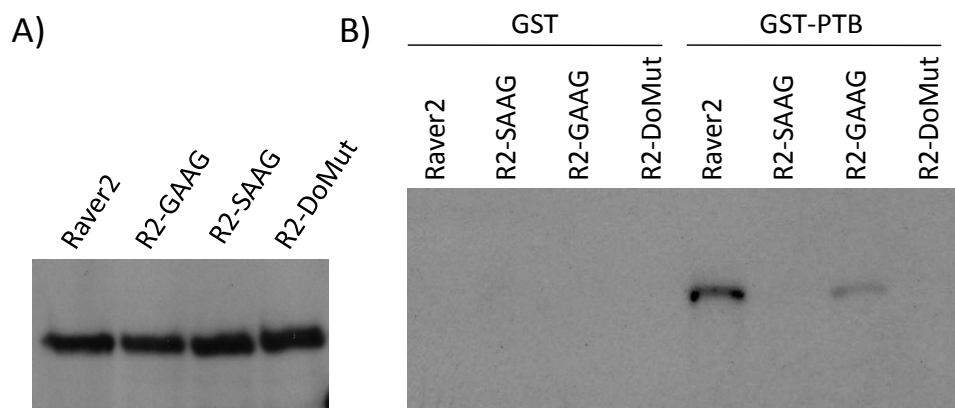


Abbildung 29: Die Raver2-Mutanten zeigen eine stark reduzierte Bindung an PTB. Radioaktiver „Pulldown“ mit *in vitro* translatierten Raver2-Konstrukten. A) Je 2 µl des jeweiligen *in vitro* Translationsansatzes wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie. B) Je 12,5 µl des *in vitro* translatierten Raver2-Proteins und den PTB-Bindungsvarianten (SAAG, GAAG und DoMut) wurden mit 2 µg GST-PTB inkubiert, welches an Glutathion Sepharose 4 Fast Flow gebunden war. Als Kontrollen wurden anstatt des PTB-GST nur GST verwendet. Gebundene Raver1-Proteine konnten anschließend mittels Autoradiographie nachgewiesen werden.

„Dot-Overlay“-Analysen ist erkennbar, dass die R2-GAAG-Mutante im Vergleich zum Raver2-Wildtyp eine schwächere aber trotzdem deutlich nachweisbare Interaktion mit PTB zeigt. Die R2-SAAG-Mutante sowie die Kombination beider Mutationen in der Raver2-Doppelmutante hingegen weisen eine kaum nachweisbare Bindung an PTB auf.

Insgesamt wird die Bindung an PTB also durch beide Mutationen geschwächt. Den stärkeren Einfluss auf die PTB-Interaktion hat dabei das SLLG-Motiv der Mutante 2 (R2-SAAG), welches dem M3 Motiv in Raver1 entspricht. Auch im zellulären Kontext ist lediglich dieses Motiv für eine effiziente Rekrutierung von Raver1 in PNCs essentiell. Dies trifft sowohl für Raver1 (Abbildung 22) als auch für Raver2 zu (Diplomarbeit S. Becke, 2007).

Abschließend sollte mit rekombinanten Proteinen überprüft werden, ob eine beeinträchtigte Bindung von Raver2 an PTB auch Auswirkungen auf die Bildung von trimeren RNA-Protein-Komplexen hat. Da die Raver2-Doppelmutante insgesamt die schwächste Interaktion mit PTB zeigte, wurde diese vergleichend zum Raver2-Wildtyp analysiert. Die Untersuchung der Komplexe erfolgte mit dem bereits in Kapitel 3.1.1 beschriebenen RiHoPB-Test.

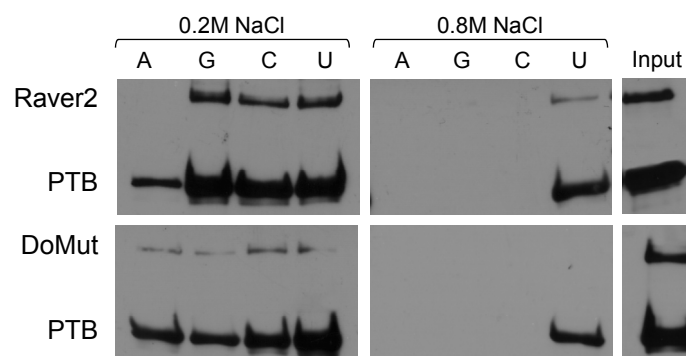


Abbildung 30: Die Raver2-Doppelmutante zeigt eine stark reduzierte Bindung an den PTB-RNA-Komplex. RiHoPB-Tests von Raver2 und der Doppelmutante (DoMut) mit PTB. Es wurden jeweils 25 pmol des zu untersuchenden rekombinanten Proteins (Input) mit einer der Ribohomopolymer-Agarosen (Riboadenosin- (A), Riboguanosin- (G), Ribocytidin- (C) oder Ribouridin-Agarosen (U)) inkubiert. Zur Erhöhung der Stringenz wurden verschiedene Salzkonzentrationen verwendet (0,2 M - 0,8 M NaCl). Der Nachweis von gebundenem Protein nach Zentrifugation der Agarose-beads erfolgte nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel mittels Immunoblot. Zur Detektion von Raver2 und DoMut wurde der BiPro-Antikörper 4A6 verwendet. PTB wurde durch den monoklonalen BB7 Antikörper nachgewiesen.

Rekombinantes Raver2-Protein sowie R2-DoMut wurde zunächst mit PTB inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen und anschließend zu den Ribohomopolymeren A, G, C und U gegeben. Der in Abbildung 30 dargestellte Versuch wurde unter steigenden Salzkonzentrationen durchgeführt (0,2 M und 0,8 M NaCl). Der Immunoblot zeigt, dass Raver2-Wildtyp unter nicht-stringenten Bedingungen (0,2 M NaCl) zusammen mit PTB an Riboguanosin-, Ribocytidin- und Ribouridin-beads bindet. Unter stringenten Salzbedingungen

(0,8 M NaCl) sind Raver2-PTB-Komplexe nur noch in der PolyU-Probe nachweisbar. Die Doppelmutante zeigt ebenfalls ein sehr schwaches Signal für alle vier Ribohomopolymere bei 0,2 M NaCl. Diese Bindung wird jedoch bei hoher Stringenz vollständig unterdrückt, so dass keine trimeren Komplexe mehr nachweisbar sind. Diese Daten zeigen, dass beide Bindungsmotive im Raver2-Protein essentiell sind und somit auch entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von trimeren Raver2-PTB-RNA-Komplexen nehmen.

Im Gegensatz zu dem von Rideau et al. (2006) postulierten Modell scheint die Assoziation von Raver1 mit PTB im Wesentlichen über das SLLG-Bindungsmotiv (M3) zu erfolgen, über das auch im Raver2-Protein die Bindung an PTB vorrangig vermittelt wird. Durch Mutationen dieses Motivs wird die Rekrutierung beider Raver-Proteine in zelluläre PNCs negativ beeinflusst. Für Raver2 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Mutation des SLLG-Motivs ausreicht, um eine effiziente Assoziation mit PTB *in vitro* zu verhindern.

3.3 Beteiligung von Raver1 an PTB-vermittelten Spleißprozessen

Während die Bindung von Raver1 an PTB bereits mehrfach beschrieben wurde (Hüttelmaier et al., 2001; Rideau et al., 2006) und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurde, ist über die zelluläre Funktion von Raver1 bisher nur wenig bekannt. Erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung von Raver1-PTB-Komplexen ergaben sich aus *in vitro* Untersuchungen bei denen sich zeigte, dass Raver1 möglicherweise als Co-Repressor in PTB-vermittelten Spleißprozessen agiert (Gromak et al., 2003, Rideau et al., 2006). Untersuchungen an Minigen-Konstrukten, des α -Tropomyosins deuteten dabei auf eine verstärkte Repression des Glattmuskel-spezifischen Exon3 durch Raver1 in PAC1-Zellen hin. Basierend auf diesen Befunden sollte nun *in vivo* untersucht werden, ob Raver1 tatsächlich an PTB-vermittelten Spleißprozessen beteiligt ist. Vergleichende Analysen von Wildtyp-Mäusen und Raver1-defizienten Tieren (Raver1-KO-Mäuse) mittels quantitativer „real-time“ PCR (qPCR) sollten dabei zeigen, ob die Inaktivierung des Raver1-Gens somit einen Einfluss auf das Spleißmuster bekannter PTB-Ziel-RNAs (im Folgenden als PTB-Zielgene bezeichnet) hat. In den Raver1-KO-Mäusen wurden die Exons 1-3 des Raver1-Gens deletiert und schließlich das Gen vollständig inaktiviert (Lahmann et al., 2008). Sämtliche Tiere wurden freundlicherweise von Prof. H.H. Arnold zur Verfügung gestellt. Für die qPCR-Analysen wurde die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben (Hirn, Darm, Herz, Uterus, Lunge) adulter Wildtyp- und Raver1-KO-Mäusen präpariert und mittels reverser Transkription

(RT-PCR) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs wurden zunächst auf Reinheit und Menge überprüft sowie der Genotyp der Spendertiere verifiziert.

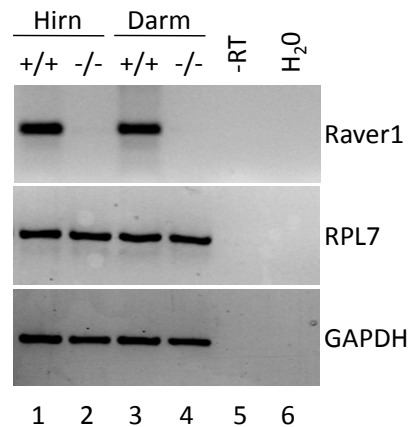


Abbildung 31: Exemplarische Analyse der Raver1 Expression in Wildtyp- und Raver1-KO-Mäusen. Agarosegele von Raver1- und Kontroll-PCR-Produkten. 1 µg generierte cDNA aus Maus-Hirn und -Darm wurde als Template für die PCR verwendet. Die Spuren 1 und 3 zeigen Produkte aus einer Wildtyp-Maus (+/+). Die Amplifikate der Raver1-KO-Maus wurde in den Spuren 2 und 4 aufgetragen. Zum Nachweis von genomischer DNA und möglichen Verunreinigungen wurden als zusätzliche Kontrollen in Spur 5 eine -RT-Probe und in Spur 6 eine Wasserkontrolle aufgetragen. Spezifische Raver1-Primer, welche die Exons 6 und 7 amplifizieren, dienten zum Nachweis des „knock out“ (oben). Zur Bestimmung äquivalenter Mengen an cDNA Template wurden Primer für RPL7 (Mitte) und GAPDH (unten) als Kontrollen verwendet.

In Abbildung 31 ist dazu exemplarisch eine PCR-Analyse dargestellt, bei der Hirn- und Darmgewebe einer Wildtyp- und einer Raver1-KO-Maus untersucht wurden. Anhand von Raver1-spezifischen Primern, welche die Exons 6 und 7 amplifizieren, konnte der jeweilige Genotyp bestätigt werden. Der Einsatz äquivalenter Mengen an cDNA Template wurde anhand von zwei Kontrollen überprüft. Sowohl die Kontrolle RPL7 (ribosomales Protein L7) als auch GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) zeigen in Raver1-KO-Mäusen und Wildtyp-Tieren Banden gleicher Intensität. Die in Spur 5 dargestellte -RT-Kontrolle zeigt die RT-Reaktion ohne reverse Transkriptase. Durch diese Kontrolle konnten Kontaminationen der RNA-Isolierung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Spur 6 zeigt eine zusätzliche Wasser-Kontrolle, um auszuschließen, dass sich Verunreinigungen in dem PCR-Ansatz selbst befanden. Nach der Präparation der RNA aus den Mäusen und anschließender RT-PCR, konnten die generierten cDNAs als Template für funktionelle Analysen weiter verwendet werden. Für sämtliche Analysen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten cDNAs wurden Kontrollen entsprechend der in Abbildung 31 gezeigten Analysen durchgeführt, um sowohl den jeweiligen Genotyp zu verifizieren als auch die Qualität und Konzentration der cDNA-Proben zu bestimmen.

3.3.1 Vergleichende Analysen von Wildtyp- und Raver1-defizienten Mäusen in Bezug auf alternative Spleißvarianten von sechs PTB-Zielgenen

Zur Untersuchung alternativer Spleißprozesse in den Raver1-defizienten Mäusen wurden insgesamt sechs Zielgene ausgewählt, aus deren prä-mRNA zwei Isoformen durch alternatives Spleißen generiert werden können und für die PTB als Repressor von einer der beiden Spleißvarianten bereits identifiziert wurde. Dazu zählen die Gene des α -Tropomyosin (Gooding et al., 1998), α -actinin (Southby et al., 1998), FGF-Rezeptor2 (=„fibroblast growth factor receptor2“, Carstens et al., 2000), GABA-R γ 2 (=„gamma-aminobutyric acid receptor gamma2“, Ashiya & Grabowski, 1997), c-src (Chan & Black, 1997) und PTB selbst (Wollerton et al., 2004). In Abbildung 32 sind schematisch die Mechanismen der Spleißprozesse dieser sechs Gene dargestellt. Bei der Auswahl der Zielgene wurden dabei unterschiedliche Spleißmechanismen berücksichtigt (siehe Einleitung Abbildung 2). So sind in Abbildung 32 A-C drei ausgewählte Gene dargestellt, deren Spleißen über alternative Inkorporation von Exonen zur Expression gewebespezifischer Isoformen führt: Während beispielsweise die Glattmuskel-spezifische Variante des α -Tropomyosins durch die Präsenz von Exon2 charakterisiert ist, führt die alternative Inkorporation von Exon3 zur Expression einer Nicht-Muskel Isoform des Proteins. Im Falle des α -actinins können ein Nicht-Muskel (NM) oder Glattmuskel (SM) spezifisches Exon inkorporiert werden, so dass ebenfalls die dazugehörigen Isoformen in den entsprechenden Geweben exprimiert werden. Beim FGF-Rezeptor2 wird durch das alternative Spleißen der Exons IIIb und IIIc zwischen einer epithelialen und einer mesenchymalen Isoform unterschieden. Durch das alternative Spleißen der RNAs von GABA-R γ 2, c-src und PTB selbst entstehen die verschiedenen Isoformen durch Inkorporation oder Exon-Ausschluss („Exon-Skipping“) von nur einem Exon (Abbildung 32 D-F). Für GABA-R γ 2 und c-src wird somit zwischen einer neuronalen und einer nicht-neuronalen Form unterschieden, wobei letztere jeweils durch den Ausschluss des entsprechenden Exons charakterisiert ist.

In all diesen Spleißprozessen fungiert PTB als Repressor, so dass durch Bindung von PTB an die pyrimidinreichen Sequenzen des Exons selbst oder der flankierenden Introns die Inkorporation des Exons verhindert, und somit die Bildung des alternativen Spleißproduktes begünstigt wird. Im Fall von α -Tropomyosin wirkt PTB beispielsweise als Repressor des Nicht-Muskel Exon3 (indiziert in Abbildung 32 durch „PTB-“) und begünstigt daher die Bildung der Glattmuskelvariante des Proteins. Im Gegensatz dazu reprimiert PTB das SM-Exon der Glattmuskel-spezifischen Variante des α -actinin-Gens.

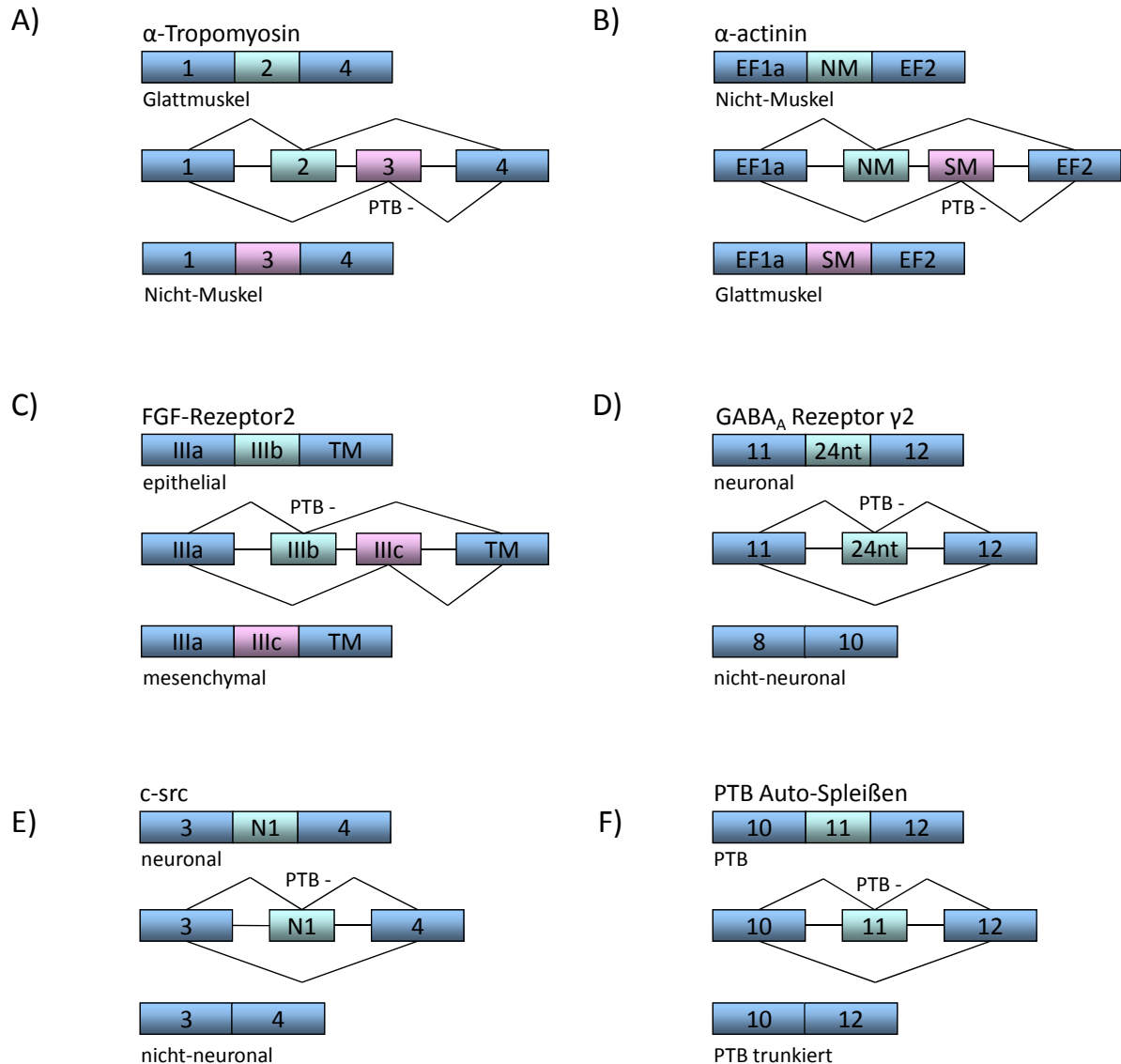


Abbildung 32 Darstellung der durch PTB vermittelten Spleißprozesse der in der Arbeit untersuchten Gene. Sowohl die alternative Inkorporation von Exons (A-C) als auch „Exon-Skipping“-Prozesse (D-F) wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Repression eines Exons durch PTB ist gekennzeichnet (PTB-).

- (A) Die Repression des Nicht-Muskel Exon3 durch PTB begünstigt die Expression der Glattmuskel-spezifischen Isoform (Exon2) von α -Tropomyosin.
- (B) PTB reprimiert das Glattmuskel-spezifische SM-Exon von α -actinin, wodurch es zu einer erhöhten Inkorporation des Nicht-Muskel-Exons (NM) kommt und somit mehr Nicht-Muskel α -actinin gebildet wird.
- (C) Durch die alternative Inkorporation des ExonIIIb und -IIIc im FGF-Rezeptor2, wird entweder die epitheliale Form des Rezeptors (IIIb) oder die mesenchymale Variante (IIIc) gebildet. PTB fungiert hierbei als Repressor der epithelialen Isoform.
- (D) Die Inkorporation des Kassettenexons 24nt im GABA_A Rezeptors γ 2 führt zur neuronalen Variante des Proteins. Durch Repression desselben Exons durch PTB wird die nicht-neuronale Variante von GABA_A Rezeptors γ 2 vermehrt exprimiert.
- (E) Die Repression des neuronalen N1-Exons im c-src-Gen wird ebenfalls durch Anwesenheit des PTB Proteins verstärkt, wodurch es zu einer erhöhten Expression der nicht-neuronalen Variante des Proteins kommt.
- (F) Im PTB-Autospleißvorgang reguliert PTB seine eigene Expressionsstärke, in dem es das Kassettenexon 11 reprimiert und somit eine trunzierte Form des Proteins gebildet wird, welche durch den zellulären Kontrollmechanismus NMD (nonsense-mediated mRNA decay) erkannt und abgebaut wird.

Das alternative Spleißen des FGF-Rezeptor2 (FGF-R2) ist dadurch charakterisiert, dass PTB die epitheliale Isoform durch Repression des IIIb-Exons unterdrückt, wodurch es zu einer erhöhten Expression der mesenchymalen Variante durch die Integration des IIIc-Exons in die mRNA kommt. Bei den durch „Exon-Skipping“ charakterisierten Spleißprozessen begünstigt PTB als Repressor der Exonkassetten jeweils den Ausschluss derselben. Für GABA-R γ 2 und c-src wird hierdurch jeweils die Bildung einer nicht-neuronalen Isoform bevorzugt. Eine Art autokatalytische Regulation der PTB-Expression erfolgt im Rahmen des PTB-Autospleißens, indem die Anwesenheit von PTB die Inkorporation von Exon11 des eigenen Gens verhindert. Hierdurch entsteht eine verkürzte (trunkierte) Form von PTB durch Generierung eines verfrühten Stoppcodons. Diese mRNA wird über entsprechende zelluläre Kontrollmechanismen erkannt und degradiert (nonsense-mediated mRNA decay =NMD, Wollerton et al., 2004).

Alle cDNAs wurden nach entsprechender Qualitätskontrolle (siehe Abbildung 31) im Folgenden mittels qPCR auf die jeweiligen Spleißvarianten der sechs ausgewählten Zielgene PTB-vermittelter Spleißprozesse analysiert. Die Methode der qPCR bietet dabei den entscheidenden Vorteil, dass die Zunahme des zu amplifizierenden Produktes über die Zeit verfolgt werden kann. Hierfür wurde der Farbstoff SYBR[®] Green I verwendet, der in DNA-Molekülen interkaliert. Mit diesem kann in der exponentiellen Phase der Reaktion der Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Menge des PCR-Amplifikats beobachtet werden. Alle Proben müssen dabei einen Schwellenwert (C_T-Wert) in der exponentiellen Phase durchlaufen. Dieser Wert entspricht der Anzahl der PCR Zyklen die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Da der Einbau von SYBR[®] Green I nicht spezifisch zwischen verschiedenen PCR-Produkten erfolgt, wurde nach jeder qPCR eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität bestimmt werden konnte (siehe Kapitel 2.3.19). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es bei den verwendeten Primern unter qPCR-Bedingungen zur Bildung weiterer unspezifischer Amplifikate kam.

Die Analyse eines jeden Gens erfolgte nach folgendem Schema: Mit Hilfe von spezifischen Primerpaaren wurde pro Ansatz je eine der beiden möglichen Spleißvarianten amplifiziert. Die Gesamt-RNA des untersuchten Zielgens wurde über Amplifikation eines nicht-gespleißten Bereichs desselben analysiert, um eine generelle Zu- oder Abnahme der Transkripte darstellen zu können. Für jedes Gen wurden pro Versuchsdurchlauf drei parallele Messungen durchgeführt und aus diesen anschließend der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte mehrerer, unabhängiger Analysen (zwischen n=3 und n=12) wurden zur weiteren

Analyse verwendet. Die Auswertung der durchgeführten qPCRs erfolgte durch relative Quantifizierung. Dabei wurde die Genexpression des Zielgens auf zwei weitere nicht regulierte „Housekeeping“-Gene (HK-Gene) bezogen. Als HK-Gene wurden RPLP0 (=„ribosomal protein, large, P0“) und Cyclophilin verwendet, welche als „klassische“ Referenzgene in qPCRs häufig ihre Anwendung finden (Savonet et al., 1997; Feroze-Merzoug et al., 2002). Durch die Kreuznormalisierung mit zwei HK-Genen, können Messfehler in den Analysen entschieden minimiert werden (Pfaffl et al., 2001). QPCR-Experimente in denen sich die beiden HK-Gene in der Expression signifikant unterschieden, wurden von den Auswertungen ausgeschlossen.

Die im Folgenden gewählte Darstellung als Balkendiagramm zeigt jeweils das Verhältnis der Genexpression von Raver1-KO-Mäusen zum Wildtyp in verschiedenen Geweben. Das heißt, dass die aus allen qPCR-Analysen gemittelten Werte für ein spezifisches Amplifikat (z.B. das HK-Gen Cyclophilin) aus Hirngewebe der Raver1-KO-Mäuse durch die gemittelten entsprechenden Werte der Hirnproben aus Wildtyp-Tieren dividiert wurden. Für alle mRNAs, auf die das Fehlen des Raver1-Proteins keinen Einfluss hat, sollte dieses Verhältnis den Wert 1 betragen. Dieser Wert sollte insbesondere für die HK-Gene erzielt werden, da deren Expression durch den „knock out“ von Raver1 unverändert bleiben sollte. Der Nachweis der gesamten Transkriptmenge durch Amplifikation von Spleiß-unabhängigen Bereichen des Zielgens sollte ebenfalls unbeeinflusst bleiben, sofern sich nicht Verschiebungen in Bezug auf die generelle Transkription eines Gens ergeben. Für die alternativen Spleißprodukte der Zielgene sollte sich im Falle einer Beteiligung von Raver1 an diesem Spleißprozess in einer Verschiebung des Verhältnisses „knock out“/Wildtyp äußern. Sofern in den Raver1-KO-Mäusen eine Isoform vergleichsweise weniger gebildet wird als im Wildtyp, ist das Verhältnis <1 . Umgekehrt verhält es sich, wenn in den Raver1-KO-Tieren eine Variante überproportional begünstigt wird. In diesem Fall wird der Quotient >1 sein.

Eine veränderte Genexpression von Zielgenen und Kontrollen zwischen Raver1-KO-Mäusen und Wildtyp-Tieren wurde mit Hilfe des T-Tests auf die Signifikanz dieser Verschiebung in Bezug auf die HK-Gene untersucht (Kapitel 2.3.19). In allen qPCR-Diagrammen wird im Folgenden die Signifikanz mittels folgender Symbole dargestellt: * entspricht einem p-Wert $<0,05$; ** = p-Wert $<0,005$; *** = p-Wert $<0,0005$. Initial musste zunächst überprüft werden, ob mittels qPCR-Analysen überhaupt Unterschiede in den sechs ausgewählten Zielgenen festzustellen wären. Da ein Teil der zu analysierenden Zielgene neuronal exprimierte Isoformen besitzt (GABA-R γ 2, c-src), alle weiteren Gene jedoch ausschließlich alternative Spleißformen haben, die in nicht-neuronalen Strukturen vorkommen

(α -Tropomyosin, α -actinin, FGF-R2, PTB), wurden aus den Raver1-KO- und WT-Mäusen zunächst zwei Organe (Hirn und Darm) mittels qPCR analysiert. Die Untersuchungen auf Hirngewebe sollten Aufschluss über das alternative Spleißen in neuronalen Strukturen geben. Der Darm hingegen diente als sehr heterogenes Gewebe der Untersuchung eines Querschnitts nicht-neuronaler Gewebe in den Mäusen.

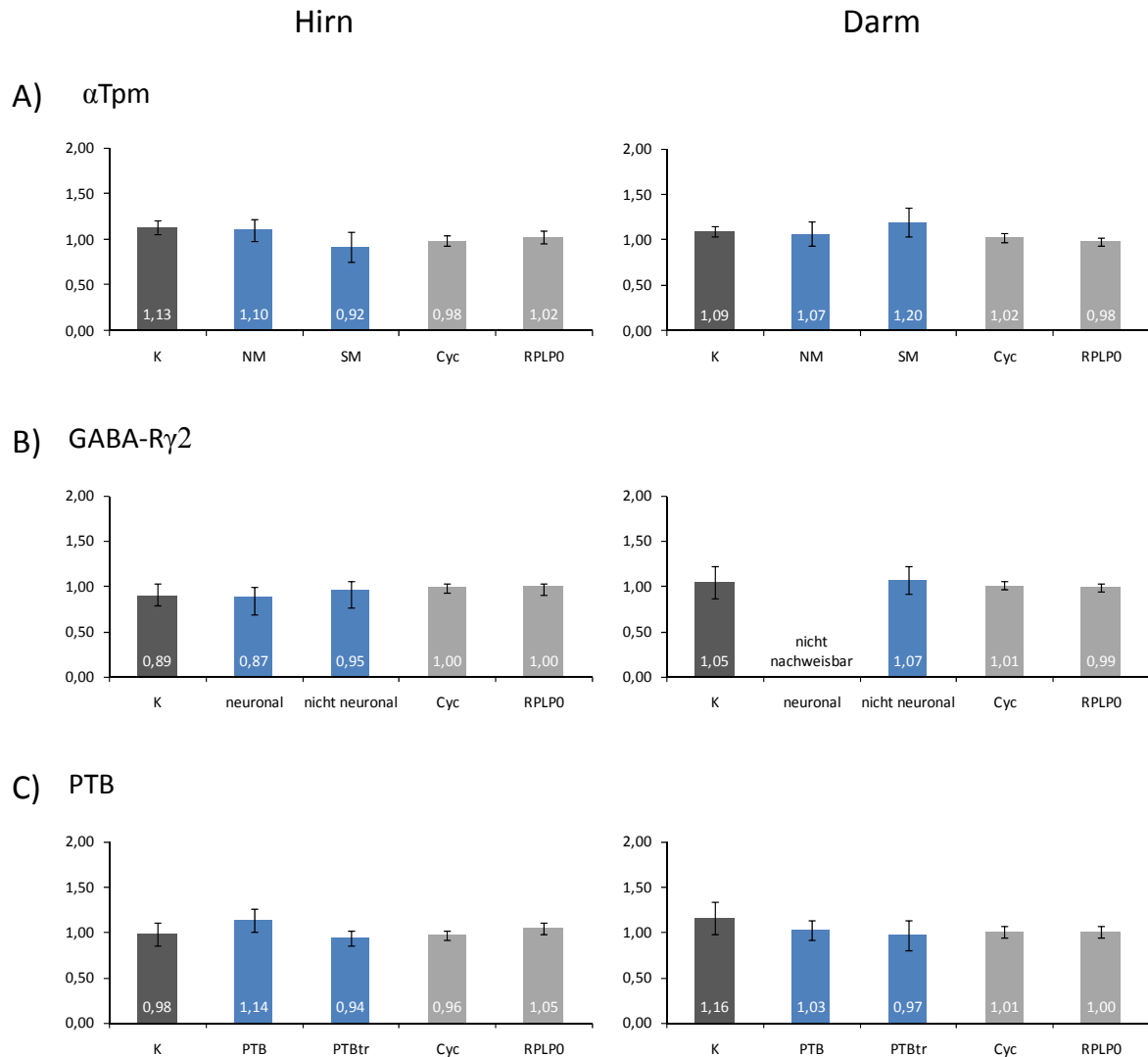


Abbildung 33: Raver1 defiziente Mäuse zeigen keine veränderten Spleißmuster in Hirn und Darm für die Gene α -Tropomyosin, GABA-Rezeptor γ 2 und PTB. Balkendiagramme quantitativer „real-time“-PCRs für die Gewebe Hirn und Darm. (A) Alternatives Spleißen von α -Tropomyosin im Hirn (links, n=7) und Darm (rechts, n=7) der Raver1 defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Analysiert wurden das Glattmuskel-spezifische Exon2 (SM) sowie das Nicht-Muskel-spezifische Exon3 (NM). (B) Spleißmuster des GABA_A-Rezeptor γ 2 hinsichtlich der Integration des 24nt-Exons (neuronal) sowie dessen Ausgrenzung aus der mRNA (nicht-neuronal) im Hirn (n=8) und im Darm (n=8). (C) Autospleißvorgang von PTB im Hirn (n=6) und Darm (n=7) durch das Kassettenexon 11. Durch die Integration des Exon11 in die mRNA entsteht das reguläre PTB-Transkript, wohingegen durch „Skipping“ des Exons eine trunkierte Form von PTB entsteht, die durch den „NMD-Pathway“ abgebaut wird. K= interne Kontrolle eines nicht alternativ gespleißten Bereichs im zu analysierenden Gen. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

In Abbildung 33 sind die qPCR-Analysen der ersten drei Zielgene dargestellt (α -Tropomyosin, GABA-R γ 2 und PTB). Daraus ist zunächst zu entnehmen, dass es in keinem der gezeigten Diagramme zu einer unterschiedlichen Genexpression der HK-Gene Cyclophilin (Balken4, Cyc) und RPLP0 (Balken5) kommt. Beide Gene wurden durch den „knock out“ von Raver1 in der Maus nicht beeinflusst, und konnten somit in allen weiteren qPCR-Analysen als Referenzgene verwendet werden. Die Analyse des α -Tropomyosins zeigte sowohl im Hirn als auch im Darm keine Verschiebung der internen α -Tropomyosin-Kontrolle (Balken1, K) in den Raver1-defizienten Mäusen. Der α -Tropomyosin-mRNA-Gehalt variiert somit nicht zwischen KO- und WT-Mäusen. Die Genexpression der Nicht-Muskel-spezifischen Isoform (Balken2, NM = „non muscle“) sowie der Glattmuskel-Spleißform (Balken3, SM = „smooth muscle“) bleiben in Raver1-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls unverändert. Eine leichte Zunahme der SM-Exon Integration in die mRNA (Wert: 1,20) ist im Darm zu erkennen. Diese Zunahme musste jedoch nach Durchführung von insgesamt sieben Versuchsreihen als nicht-signifikant eingestuft werden. Die in Abbildung 33 B dargestellten Diagramme zeigen die Spleiß-Analysen des GABA-R γ 2 im Hirn und Darm der Mäuse. Wie beim α -Tropomyosin kommt es zu keiner signifikanten Verschiebung der neuronalen / nicht-neuronalen Isoform im Hirn (Balken2, neuronal; Balken3, nicht-neuronal). Im Darm konnten ebenfalls keine Veränderungen der nicht-neuronalen Isoform beobachtet werden. Die Integration des 24nt-Exons in die GABA-R γ 2-mRNA konnte in diesem Gewebe gar nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein (Wang & Burt, 1991). Der Autospleißvorgang von PTB zeigt sowohl im Hirn als auch im Darm keinen Einfluss des Raver1-„knock out“ auf die Genexpression der trunkierten PTB-Form (Balken3, PTBtr). Auch eine erhöhte Integration des Exon11 (Balken2, PTB) in die mRNA konnte nicht beobachtet werden. Somit hat der Verlust von Raver1 in den Mäusen keinen signifikanten Einfluss auf das Spleißverhältnis der α -Tropomyosin- GABA-R γ 2- und PTB-Isoformen im Hirn und im Darm.

Die qPCR-Untersuchungen der Gene α -actinin, c-src und FGF-R2 auf den Geweben Hirn und Darm sind in Abbildung 34 als Balkendiagramme dargestellt. Wie auch in Abbildung 33 zeigen die internen Kontrollen (K) und HK-Gene (Cyc und RPLP0) keinen Unterschied in der Genexpression zwischen Raver1-KO- und WT-Mäusen. Der Gesamt-Gehalt der mRNA von α -actinin, c-src und FGF-R2 bleibt somit durch den „knock out“ von Raver1 in den Mäusen unverändert.

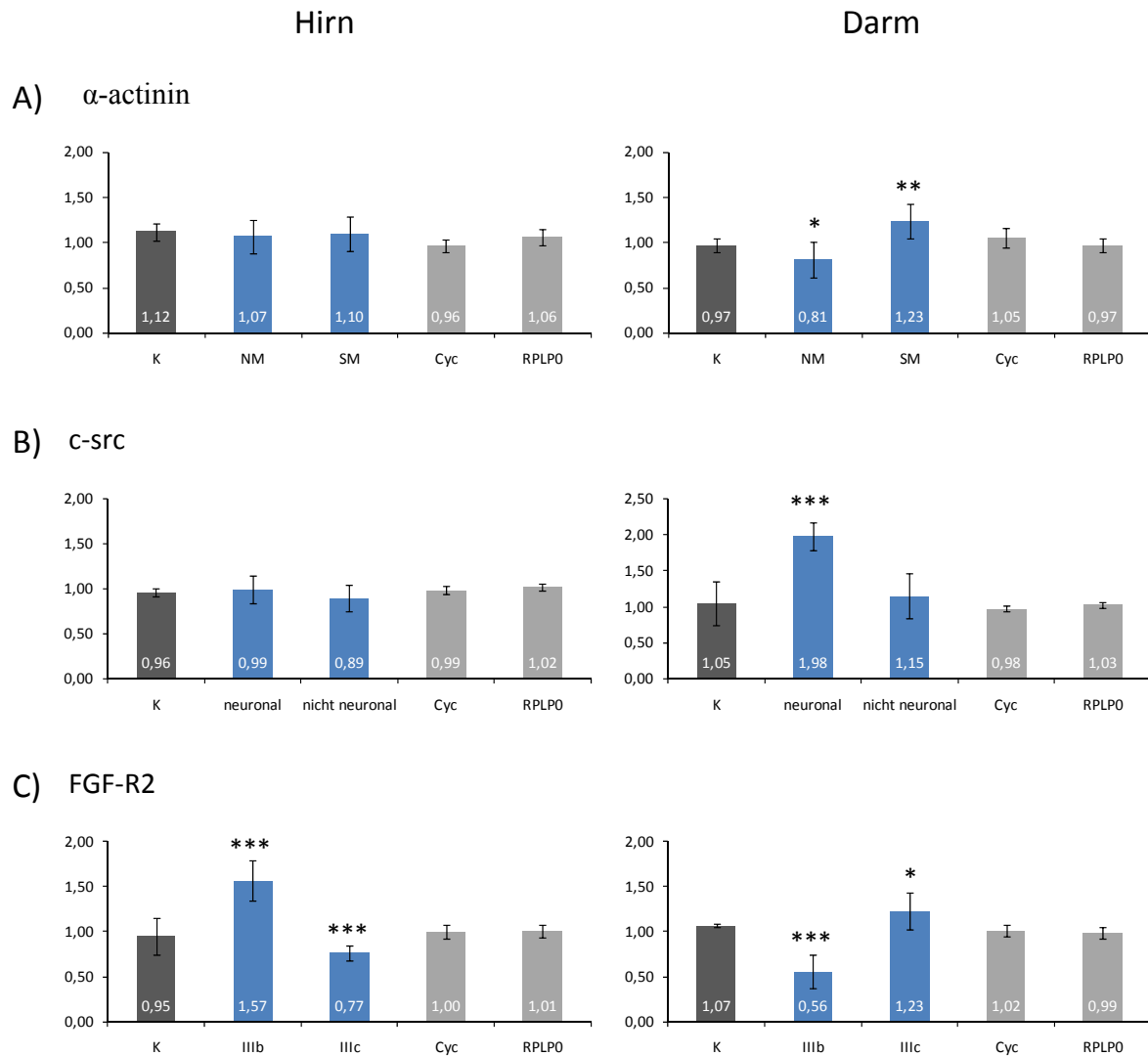


Abbildung 34: Der „knock out“ von Raver1 in der Maus führt zu Spleißverschiebungen in Hirn und Darm für die Gene α -actinin, c-src und FGF-Rezeptor2. Diagramme der qPCRs für die Gewebe Hirn und Darm. (A) Alternative Spleiß-Analysen des α -actinin-Gens im Hirn (links, n=10) und Darm (rechts, n=11) in Raver1 defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Analysiert wurden die Glattmuskel-spezifische Isoform (SM) sowie die Nicht-Muskel-spezifische Spleißvariante (NM). (B) Alternatives Spleißen des in neuronalen Strukturen integrierten N1-Exons, sowie dessen Ausschluss aus der mRNA (nicht-neuronal) im Hirn (n=11) und im Darm (n=9). (C) Darstellung der unterschiedlichen Spleißmuster des FGF-R2 in Hirn (n=9) und Darm (n=12). ExonIIIb wird vorrangig in epithelialen Geweben inseriert, wohingegen ExonIIIc die mesenchymale Isoform darstellt. K= interne Kontrolle eines nicht alternativ gespleißten Bereichs im zu analysierenden Gen. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

Im Hirn konnte für Raver1 keine Beteiligung am PTB-vermittelten Spleißen des α -actinin-Gens identifiziert werden (Abbildung 34 A, links). Weder die Nicht-Muskel-spezifische Variante (Balken2, NM) noch die durch PTB reprimierte Glattmuskel-Isoform (Balken3, SM) wurden durch den „knock out“ von Raver1 beeinflusst. Allerdings gibt es in neuronalen

Strukturen eine weitere α -actinin-Isoform, bei der sowohl das NM- als auch das SM-Exon in die mRNA integriert werden (Kremerskothen et al., 2002). Diese Isoform wurde auf Grund der Primer-Positionen in dieser Arbeit nicht analysiert. Die Spleiß-Analysen des Darms (Abbildung 34 A, rechts) zeigen hingegen eine signifikante Zunahme des SM-Exons in den Raver1 defizienten Mäusen. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Raver1 als Co-Repressor in PTB-vermittelten Spleißprozessen agiert. Durch Fehlen des Co-Repressors im Darmgewebe steigt die Inkorporation des eigentlich durch PTB reprimierten Glattmuskel-Exons an. Gleichzeitig nimmt der Anteil des NM-Exons im Darm der Raver1-KO-Mäuse signifikant ab. Dies ist möglicherweise eine Folge der Zunahme des SM-Exons. Auch in den Untersuchungen der c-src-mRNA kommt es im Darm zu einer Verschiebung der neuronalen Variante (Abbildung 34 B, rechts). Diese steigt in den Raver1-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich an (Balken2, neuronal). Zu dem ist die erhöhte Integration des N1-Exons durch einen p-value $< 0,0005$ gekennzeichnet. Das „Skipping“ des N1-Exons scheint in den Raver1 defizienten Mäusen jedoch unbeeinflusst (Balken3, nicht-neuronal). Dazu ist allerdings anzumerken, dass die Zunahme einer Isoform nicht zwingend die Abnahme der alternativen Spleißvariante bedeuten muss, da die Regulation des alternativen Spleißens über eine große Anzahl von Proteinen erfolgt (Kapitel 1.2). Im Hirn konnte für Raver1 keine Beteiligung am alternativen Spleißen des c-src-Gens beobachtet werden, da es zu keiner Verschiebung der neuronalen oder nicht-neuronalen Isoform kommt (Abbildung 34 B, links). Als letztes Zielgen zeigt der FGF-R2 ein interessantes Spleißmuster in den Raver1-„knock out“-Mäusen (Abbildung 34 C). Hierbei kommt es im Hirn zu einer hoch signifikanten Zunahme der epithelialen ExonIIIb-Integration in die mRNA (Balken2). Dieser Anstieg des durch PTB reprimierten ExonIIIb würde Raver1 als Co-Repressor dieses Exons bestätigen. Ebenfalls hoch signifikant ist die Abnahme des mesenchymalen ExonIIIc durch den Raver1 „knock out“. Es ist denkbar, dass beide Isoformen abhängig von einander gespleißt werden. Im Darm zeigt sich ein ganz anderes Spleißmuster beider Isoformen (Abbildung 34 C, rechts). Während es hier zu einer Abnahme der epithelialen Isoform kommt (Balken2), wird das ExonIIIc verstärkt in die mRNA integriert (Balken3). Damit verhält sich das Spleißmuster des FGF-R2 im Darm genau gegensätzlich zum Muster im Hirngewebe.

Zusammenfassend zeigen die initialen Analysen an Hirn- und Darmgewebe, dass die Inaktivierung von Raver1 durchaus einen selektiven, signifikanten Einfluss auf die relative Verteilung von Spleißvarianten nehmen kann. Die gewebespezifischen Verschiebungen in den Spleißmustern wurden in einem zweiten Schritt dahingehend überprüft, ob sie mit der so genannten Co-Repressor-Theorie für Raver1 in Einklang gebracht werden konnte. Sollte

Raver1 demnach die reprimierende Wirkung von PTB verstärken, würde die Inaktivierung des Raver1-Gens dazu führen, dass in den Raver1-KO-Mäusen vergleichsweise mehr mRNA für die Spleißvariante nachzuweisen ist, die in den Wildtyp-Mäusen durch PTB reprimiert wird (siehe auch Abbildung 32). So konnte sich im Falle des α -actinin- und c-src-Gens die Co-Repressor-Theorie im Darm *in vivo* bestätigen lassen, da in den Raver1-defizienten Mäusen mehr mRNA für die Glattmuskel-spezifische Variante des α -actinin und neuronale Isoform des c-src nachgewiesen wurde und das Verhältnis „knock out“/Wildtyp sich deshalb zu einem Wert >1 verschiebt. Für den FGF-R2 konnte im Hirn die Co-Repressor-Theorie bestätigt werden, wohingegen der Darm ein genau gegensätzliches Spleißmuster zeigte.

Die in Abbildung 34 gezeigten Spleiß-Analysen von α -actinin, c-src und FGF-R2 verdeutlichen die Gewebespezifität solcher Prozesse, da der Raver1 „knock out“ bereits in zwei verschiedenen Mausgeweben unterschiedliche Auswirkungen auf das alternative Spleißen eines Zielgens zeigt. Daher wurden weitere Organe aus Mäusen präpariert, um die Raver1-defizienten Mäuse bezüglich ihrer Spleißmuster besser charakterisieren zu können. Die neu generierten cDNAs aus den Geweben Herz, Uterus, Lunge, Milz und Skelettmuskel wurden wie zuvor beschrieben mittels qPCR analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass in der Milz und im Skelettmuskel die Ergebnisse der qPCR-Analysen zwischen den einzelnen Versuchsreihen stark variierten (Daten nicht gezeigt). Es wurden daher nur die Ergebnisse der Gewebe aus Herz, Uterus und Lunge mit in die Auswertung dieser Arbeit einbezogen.

Diese weiteren qPCR-Analysen beschränkten sich dabei auf die Gene α -Tropomyosin, c-src und FGF-R2, die hinsichtlich ihrer alternativen Spleißprozesse untersucht wurden. Die Auswahl dieser drei Gene erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten: Bisher ist α -Tropomyosin das am besten charakterisierte PTB-Zielgen, für dessen alternatives Spleißen bereits eine Beteiligung von Raver1 zumindest *in vitro* gezeigt werden konnte (Gromak et al., 2003a, Rideau et al., 2006). Mit c-src wurde ein neuronales Zielgen ausgesucht. Diese Auswahl beruhte unter anderem darauf, dass in Raver1-KO-Mäusen Veränderungen in der Langzeitpotenzierung an hippocampalen Schnitten beobachtet wurden (Lahmann et al., 2008). Die Analysen des FGF-R2 hatten die deutlichsten Verschiebungen im Verhältnis der epithelialen und mesenchymalen Spleißvariante ergeben. Außerdem konnte für dieses Gen bereits ein gewebespezifischer Unterschied in Bezug auf die postulierte Co-Repressor-Hypothese für Raver1 festgestellt werden (Abbildung 34 C). Durch Analysen weiterer Gewebe sollten diese initialen Befunde überprüft werden.

3.3.1.1 α -Tropomyosin

Die qPCR-Analysen von α -Tropomyosin auf den Geweben Herz, Uterus und Lunge sind in Abbildung 35 dargestellt. Wie in den Untersuchungen der Gewebe Hirn und Darm wurden hier die HK-Gene Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet, sowie die interne α -Tropomyosin-Kontrolle (K). Keine dieser Kontrollen zeigte eine signifikante Veränderung in den Raver1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Es ließ sich allerdings feststellen, dass die interne α -Tropomyosin-Kontrolle im Uterus und in der Lunge vergleichsweise hohen Schwankungen unterlag (K in Abbildung 35 B und Abbildung 35 C).

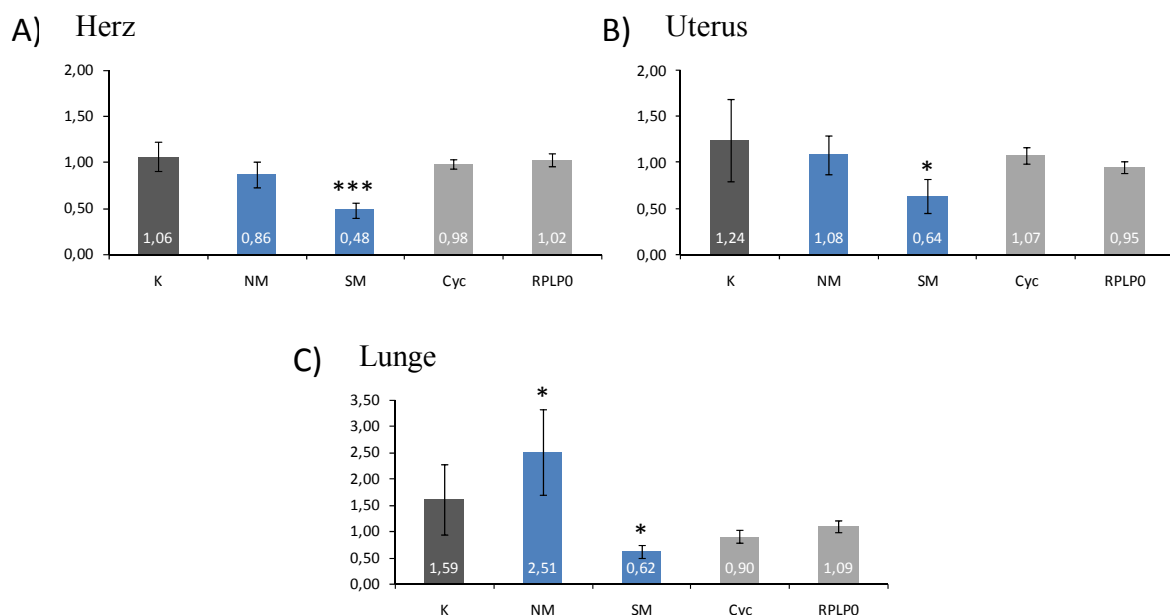


Abbildung 35: Raver1-defiziente Mäuse weisen eine signifikante Verschiebung im Spleißverhältnis des α -Tropomyosin-Genes in Herz, Uterus und Lunge auf. Untersuchungen der relativen Verteilung alternativer Spleißprodukte des α -Tropomyosin-Genes. (A) qPCR-Analysen des α -Tropomyosin-Genes im Herz (n=6) in Raver1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. (B) Spleiß-Analysen von α -Tropomyosin im Uterus (n=6) und (C) in der Lunge (n=5). Analysiert wurde der Einfluss des Raver1 „knock out“ auf die Nicht-Muskel- und Glattmuskel-spezifische Isoform von α -Tropomyosin. K= interne Kontrolle eines nicht alternativ gespleißten Bereichs im α -Tropomyosin-Gen. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen in Hirn und Darm konnte in allen drei Geweben (Herz, Uterus, Lunge) eine signifikante Abnahme der Glattmuskel-spezifischen Variante des α -Tropomyosin festgestellt werden. Eine signifikante Zunahme der komplementären Nicht-Muskel Isoform wurde jedoch lediglich in Lungengewebe beobachtet (Abbildung 35 C). Diese relative Verschiebung des Spleißverhältnisses in der Lunge würde somit der

Co-Repressor-Theorie für Raver1 entsprechen. In Herz und Uterus würde zumindest die Abnahme der Glattmuskel-Variante ebenfalls diese Annahme unterstützen.

3.3.1.2 c-src

Für c-src hatten die vorherigen Analysen im Hirn und Darm zumindest für letzteres Gewebe eine signifikante Erhöhung der neuronalen Variante ergeben und somit erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Raver1 als Co-Repressor in PTB-vermittelten Spleißprozessen gegeben. Die qPCR-Analysen der Gewebe Herz, Uterus und Lunge für das c-src-Gen sind in Abbildung 36 dargestellt. Auf Grund der hohen Schwankung zwischen den Messungen für die neuronale- und nicht-neuronale Spleißvariante, konnte für Raver1 keine Beteiligung am Spleißen im Uterus nachgewiesen werden (Abbildung 36 B). Lediglich eine tendenzielle Abnahme beider Isoformen ist erkennbar.

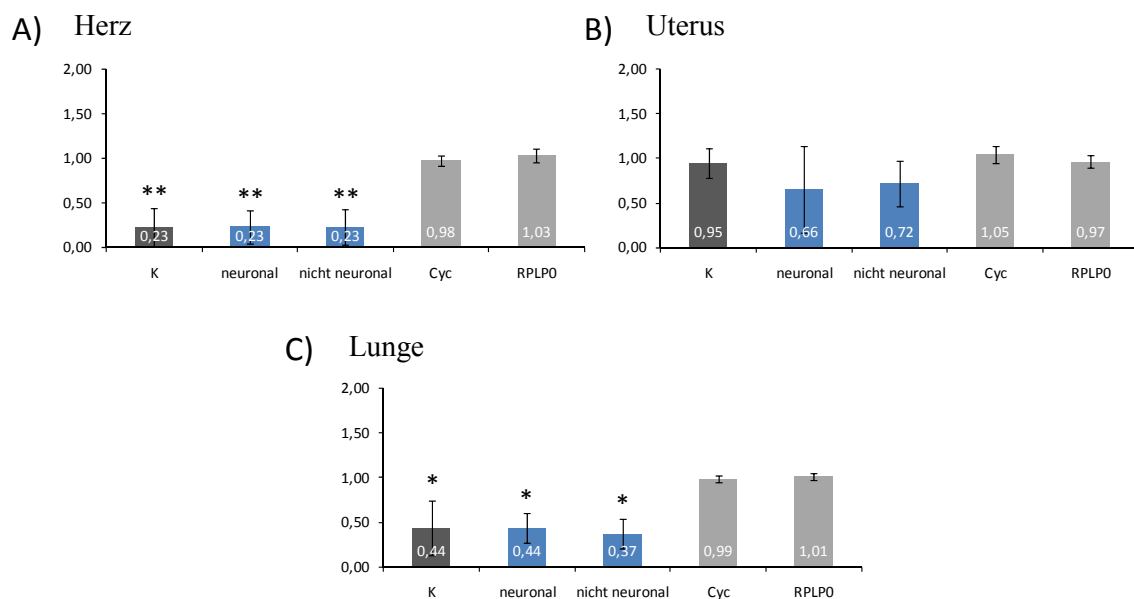


Abbildung 36: Raver1-defiziente Mäuse zeigen in Herz und Lunge eine Reduktion der c-src mRNA.

Die Balkendiagramme zeigen die relative Verteilung alternativer Spleißprodukte des c-src-Gens im Herz, Uterus und Lunge der Raver1-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. (A) Alternatives Spleißmuster der neuronalen und nicht-neuronalen c-src-Isoform im Herz (n=5) (B) im Uterus (n=5) und (C) in der Lunge (n=4) von Raver1-defizienten Mäusen. K= interne Kontrolle im konventionell gespleißten Bereich der c-src mRNA. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

Während für den Uterus keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden konnten, ergaben die Analysen an Herz und Lunge eine signifikante Abnahme der RNA-Menge beider Isoformen. Der mRNA-Gehalt sowohl der neuronalen als auch nicht-neuronalen Isoform waren gegenüber den HK-Genen deutlich erniedrigt (Abbildung 36 A und Abbildung 36 C). Die gleichzeitige Reduktion beider Spleißvarianten deutete auf einen geringeren Gesamt-RNA-Gehalt der c-src mRNA hin, der durch einen ebenfalls absinkenden mRNA-Gehalt der c-src-Kontrolle (K) bestätigt wurde, deren verwendete Primer in einem konventionell gespleißten Bereich der c-src mRNA binden. Eine Verschiebung dieser Kontrolle kann sich auf verschiedenen Mechanismen innerhalb und außerhalb alternativer Spleißprozesse begründen (siehe Diskussion Kapitel 4.3.2.1). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in der Milz beobachtet, in der allerdings die neuronale Variante prinzipiell schwer nachzuweisen war und daher starken Schwankungen unterlag (Daten nicht gezeigt). Der Grund für eine Abnahme aller drei Werte in den betroffenen Geweben konnte durch die qPCR-Analysen nicht geklärt werden.

3.3.1.3 FGF-Rezeptor2

In Hirn und Darm konnte ein gewebespezifisches Spleißmuster für den FGF-R2 identifiziert werden. Während die im Hirn beobachtete Verschiebung zu einer verstärkten Expression der epithelialen Isoform in Raver1-defizienten Mäusen mit der Co-Repressor-Theorie in Einklang gebracht werden kann, ist für den Darm eine genau gegensätzliche Veränderung festzustellen. Die Analysen an weiteren Geweben sollten daher nicht nur den gewebespezifischen Einfluss der Inaktivierung des Raver1-Gens bestätigen sondern auch zeigen, ob durch Modulation der Raver1-Expression auch Prozesse beeinflusst werden, die der Spleißaktivität von PTB entgegengesetzt sind. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Abbildung 37 dargestellt. Im Herzgewebe kommt es in den Raver1-KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zu einer hoch signifikanten Reduktion ($p < 0,0005$) der epithelialen Isoform des FGF-R2 (Abbildung 37 A). Unbeeinflusst bleibt hingegen die Bildung der mesenchymalen Spleißvariante. Im Uterus konnte ebenfalls eine tendenzielle Abnahme des IIIb-Exons beobachtet werden (Abbildung 37 B), die sich jedoch als nicht-signifikant erwies. Eine mögliche Ursache hierfür, könnte allerdings die vergleichsweise geringe Versuchszahl ($n=3$) auf diesem Gewebe sein. Eine signifikante Verschiebung des Spleißverhältnisses zu Gunsten der mesenchymalen Isoform in Raver1-defizienten Mäusen konnte in der Lunge

festgestellt werden. Hier wurde die Abnahme der epithelialen Isoform von einer Zunahme der mesenchymalen Variante begleitet (Abbildung 37 C).

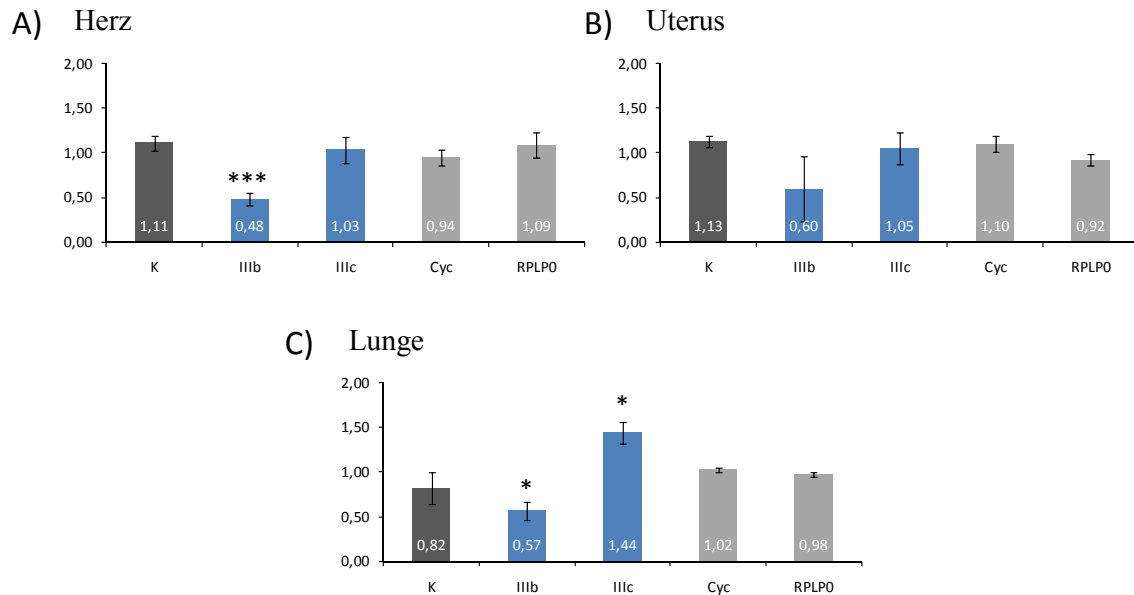


Abbildung 37: Raver1-KO-Mäuse zeigen in nicht-neuronalen Geweben eine Reduktion der epithelialen Spleißvariante des FGF-Rezeptor2. QPCR-Diagramme zur relativen Verteilung alternativer Spleißprodukte des FGF-R2-Gens in Raver1-KO-Mäusen. (A) qPCR-Analysen des FGF-R2-Gens im Herz (n=5) von Raver1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. (B) Spleiß-Analysen von FGF-R2 im Uterus (n=3) und (C) in der Lunge (n=4). Analysiert wurde der Einfluss der Raver1-Defizienz auf die epitheliale (IIIb) und mesenchymale (IIIc) FGF-R2-Isoform. K= interne Kontrolle im konventionell gespleißten Bereich der FGF-R2 mRNA. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

Durch die Analysen in drei weiteren Geweben konnte für FGF-R2 somit ein signifikanter Einfluss von Raver1 auf das gewebespezifische Spleißen bestätigt werden. Allerdings würden die beobachteten Unterschiede die angenommen Co-Repressor-Funktion von Raver1 auf PTB-vermittelte Spleißprozesse nicht bestätigen.

3.3.2 Zelluläre Analysen zum direkten Einfluss von PTB und Raver1 auf das Spleißen von α -Tropomyosin, c-src und FGF-Rezeptor2

In den in Kapitel 3.3.1 untersuchten Mäusen wurden publizierte Zielgene von PTB auf mögliche Veränderungen in ihrem alternativen Spleißmuster zweier Isoformen analysiert. Diese Analysen untersuchen somit einen indirekten Effekt der Modulation der Raver1-Expression auf Spleißprozesse, von denen angenommen wird, dass sie durch PTB vermittelt werden. Die an verschiedenen Geweben durchgeführten Analysen belegen damit jedoch nicht, dass die beobachteten Effekte tatsächlich direkt auf eine Wechselwirkung von Raver1 und PTB zurückzuführen sind. Da außerdem in verschiedenen Geweben gegensätzliche Verschiebungen der Spleiß-Aktivitäten in Bezug auf dasselbe Gen beobachtet wurden, muss sogar überprüft werden, ob diese Veränderungen in der Tat alle auf die zelluläre Aktivität des Spleißfaktors PTB zurückzuführen sind.

Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob die Verschiebungen in der relativen Expression alternativer Spleißvarianten tatsächlich eine kausale Beziehung zwischen PTB-Spleißaktivität und einem modulativen Einfluss von Raver1 darstellen, ist die selektive Inaktivierung von PTB oder Raver1 in einem vereinfachten Zellmodell. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst vergleichende qPCR-Analysen an Mausfibroblasten-Zelllinien (MEF = „mouse embryonic fibroblasts“) durchgeführt, die aus Wildtyp- und R1-KO-Mausembryonen generiert worden waren (Dissertation B. Henneberg, 2006). Bereits in den ersten Versuchsreihen wurde jedoch deutlich, dass diese Zelllinien zum einen zwischen den Versuchsreihen, aber auch innerhalb einer Referenzgruppe (WT oder Raver1-defizient) sehr starke und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt), so dass nach einem alternativen Zellsystem gesucht werden musste.

Es wurden schließlich HeLa- (Epithelzellen des Zervixkarzinoms) und HEK-Zellen (= „human embryonic kidney“) für weitere Analysen verwendet. Beide humanen Zelllinien, welche epithelialen Ursprungs sind (Gossen & Bujard, 1992; Graham & Smiley, 1977), weisen hohe Transfektionsraten auf. Des Weiteren konnte bereits in diesen Zelllinien die Beteiligung von PTB am alternativen Spleißen einiger Zielgenen, darunter c-src und FGF-R2, gezeigt werden (Wollerton et al., 2001; Wagner & Gracia-Blanco, 2002; Boutz et al., 2007). Somit stellten HeLa- und HEK-Zellen ein ideales Zellsystem dar, um über RNA-Interferenz selektiv die Expression von PTB oder Raver1 zu unterdrücken. Die Spleiß-Analysen konnten dann entsprechend den vorherigen qPCR-Analysen für α -Tropomyosin, c-src und FGF-R2

durchgeführt werden, natürlich unter Berücksichtigung human-spezifischer Sequenzen der Zielgene und der Verwendung human-spezifischer Primer zur Amplifikation.

Durch den spezifischen „knock down“ von PTB sollte überprüft werden, ob *in vivo* PTB tatsächlich als Repressor der zu analysierenden Gene α -Tropomyosin, c-src und FGF-R2 in HeLa- und HEK-Zellen wirkt. Die komplementären Bereiche der dafür verwendeten siRNA (im Folgenden als PTBsiRNA bezeichnet) befinden sich im 3'UTR des PTB-Gens (Wollerton et al., 2004). Parallel wurden für das Raver1-spezifische „gene silencing“ zwei verschiedene siRNA-Duplices getestet (R1siRNA1 und R1siRNA2) deren komplementäre Bereiche sich im N-Terminus (R1siRNA1) und C-Terminus (R1siRNA2) des Raver1-Gens befinden und welche freundlicherweise von Dr. Oliver Gruss (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden (siehe Anhang Tabelle 8).

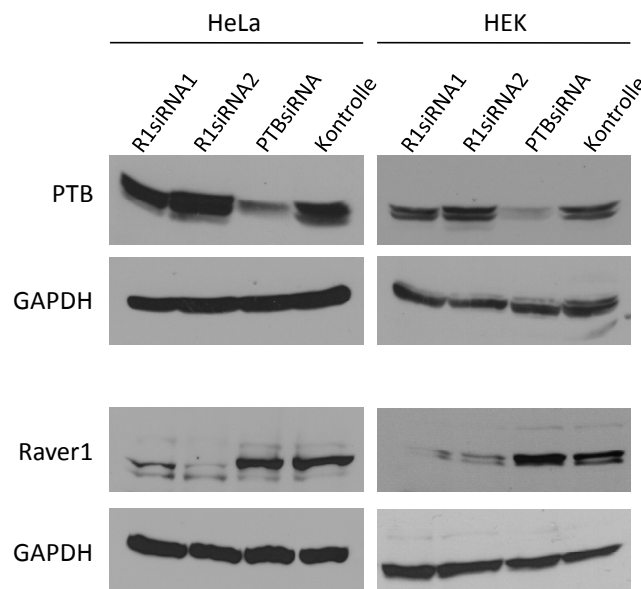


Abbildung 38: Reduktion der PTB- und Raver1-Expression nach RNAi-Behandlung. Immunoblots von HeLa- (links) und HEK-Zellextrakten (rechts) nach Behandlung mit verschiedenen siRNAs. 72 h nach Transfektion mit siRNAs gegen Raver1 (R1siRNA1 und R1siRNA2) oder PTB (PTBsiRNA) wurde die Expression von Raver1 und PTB analysiert und mit der Expression in Zellen verglichen, die mit einer „non-silencing“ siRNA (Kontrolle) behandelt worden waren. Der Nachweis von Raver1 erfolgte durch den monoklonalen 7D3-Antikörper, während für PTB der BB7-Antikörper verwendet wurde. Zur Kontrolle äquivalent eingesetzter Zellextrakt-Mengen wurde der GAPDH-Antikörper BM439 eingesetzt.

In Abbildung 38 sind die immunochemischen Analysen der siRNA-behandelten Zelllinien gezeigt. Dabei wurden die siRNA-behandelten Zellen 72 h nach Transfektion (Transfektionsreagenz Lipofectamine2000TM, Invitrogen) geerntet und Zellextrakte hergestellt. Äquivalente Proteinmengen wurden mit entsprechenden Antikörpern auf die Expression von PTB (BB7) und Raver1 (7D3) in beiden Zelllinien analysiert. Es ist zu erkennen, dass sowohl die Behandlung mit PTBsiRNA als auch mit beiden Raver1siRNAs

eine deutliche Reduktion der Expression der jeweiligen Proteine zur Folge hatte. Die Behandlung der Zellen mit „non-silencing“ siRNA (Kontrolle) wirkte sich hingegen nicht auf die Expression von PTB oder Raver1 aus. Als Kontrolle äquivalent eingesetzter Zellextrakt-Mengen diente der Nachweis von GAPDH (Antikörper BM439).

3.3.2.1 α -Tropomyosin

Zunächst wurde der Einfluss eines siRNA-vermittelten „knock down“ von PTB und Raver1 auf das Spleißen des humanen α -Tropomyosin-Gens untersucht. Eine Beteiligung von PTB am alternativen Spleißen des α -Tropomyosin-Gens in HeLa-Zellen konnte bereits gezeigt werden (Lin & Patton, 1995; Singh et al., 1995; Gooding et al., 1998). Die im Folgenden dargestellten Balkendiagramme der Spleiß-Analysen zeigen das Verhältnis von siRNA-behandelten HeLa- oder HEK-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Behandlung mit „non silencing“ siRNA). Somit können die jeweiligen Verschiebungen direkt mit den *in vivo* Analysen der Maus (Kapitel 3.3.1.1) verglichen werden.

Für α -Tropomyosin konnte durch den spezifischen „knock down“ von PTB ein Anstieg des NM-Exons (Abbildung 39 A, links) in HeLa-Zellen beobachtet werden. Dies bestätigt die repressive Wirkung von PTB auf das NM-Exon, die auch bereits mehrfach in *in vitro* Minigen-Analysen gezeigt wurde (Gromak et al., 2003; Rideau et al., 2006). Ähnlich wie beim Spleißen des α -Tropomyosin in der Lunge von Mäusen (siehe Abbildung 35 C) kommt es auch in HeLa-Zellen auch zu einem erhöhten „Skipping“ des SM-Exons. Exon2 und Exon3 stehen daher wahrscheinlich unter der Kontrolle von PTB, so dass die erhöhte Inkorporation eines Exons das „Skipping“ des anderen begünstigt. In HEK-Zellen konnte zwar nur eine signifikante Verschiebung des SM-Exons durch den „knock down“ von PTB beobachtet werden, eine tendenzielle Erhöhung war jedoch auch für das NM-Exon zu erkennen (Abbildung 39 A, rechts). Auch für Raver1 konnte ein Einfluss auf das alternative Spleißen des α -Tropomyosin-Gens in HeLa- und HEK-Zellen durch die RNAi-Experimente gezeigt werden. Bei der R1siRNA1 führt das zu einer signifikanten Verschiebung zu Gunsten des NM-Exons in HeLa-Zellen, die von einer signifikanten Abnahme des SM-Exons begleitet ist (Abbildung 39 B, links). In HEK-Zellen ist lediglich die Abnahme des SM-Exons durch Behandlung mit R1siRNA1 signifikant (Abbildung 39 B, rechts). Tendenziell zeigt auch die Behandlung mit R1siRNA2 die gleichen Ergebnisse, wobei jedoch generell stärkere Schwankungen in den Analysen zu verzeichnen waren, so dass die beobachteten Veränderungen statistisch als nicht-signifikant eingestuft werden mussten (Abbildung 39 C).

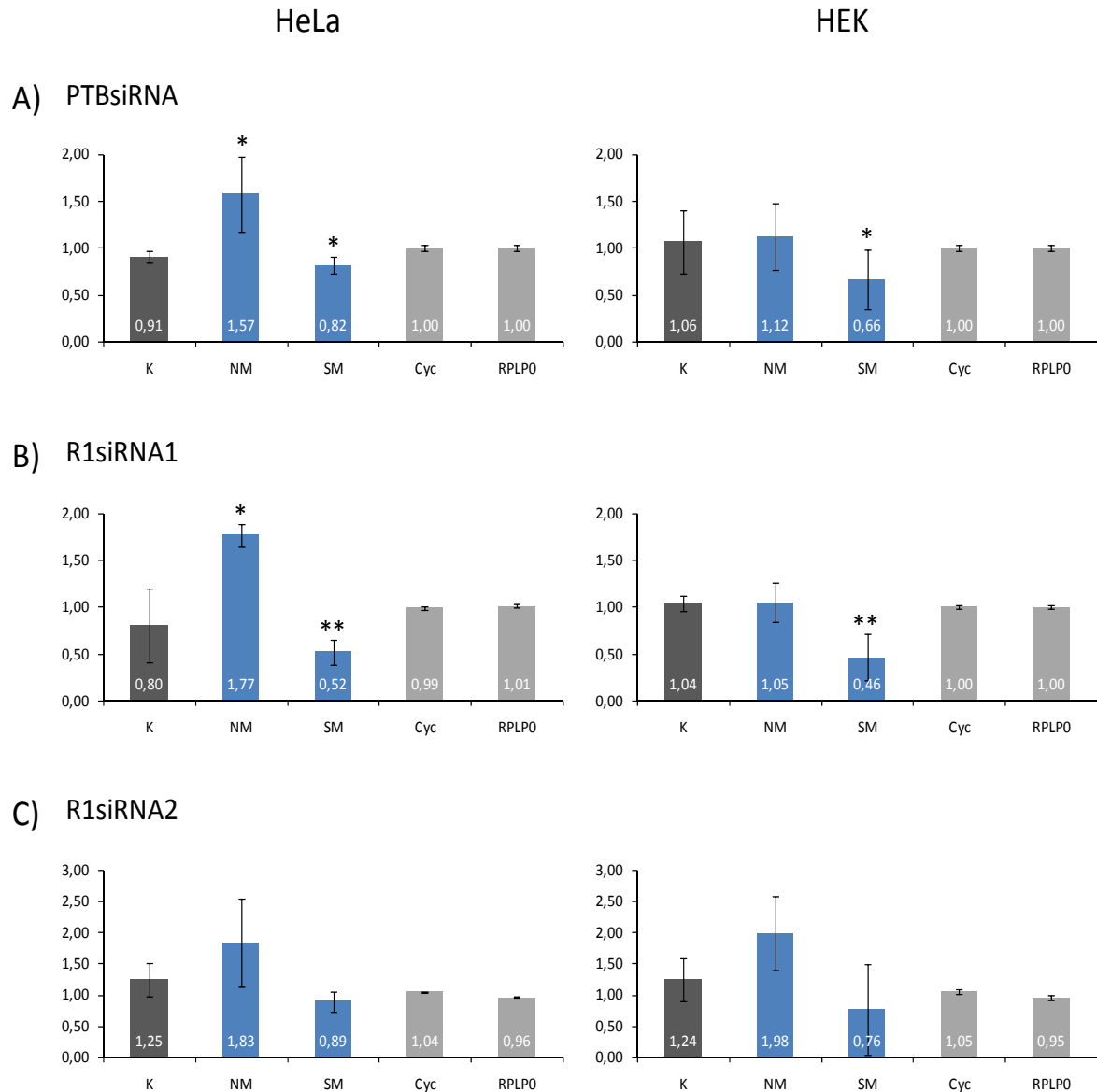


Abbildung 39: Der siRNA-vermittelte „knock down“ von PTB und Raver1 bewirkt eine Verschiebung im α -Tropomyosin-Gen zu Gunsten der NM-Variante. α -Tropomyosin-qPCR-Analysen des PTB- und Raver1-„knock down“ in HeLa- (links) und HEK-Zellen (rechts). (A) Beeinflussung des alternativen Spleißens von α -Tropomyosin Exon3 (NM) und Exon2 (SM) durch den „knock down“ von PTB in HeLa-Zellen (n=5) und HEK-Zellen (n=7). (B) Spleißverteilung der α -Tropomyosin-Isoformen durch die Behandlung mit Raver1-siRNA1 (R1siRNA1) in HeLa- (n=4) und HEK-Zellen (n=7). (C) Relative Anteile der α -Tropomyosin-Spleißvarianten durch die Raver1-siRNA2 (R1siRNA2) in HeLa-(n=4) und HEK-Zellen (n=7). K= mRNA-Kontrolle im nicht-alternativ gespleißten Bereich von α -Tropomyosin. Cyc und RPLP0 bezeichnen die zur Kreuznormalisierung verwendeten „Housekeeping-Gene“. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

In Übereinstimmung mit den Daten anderer Arbeitsgruppen (Lin & Patton, 1995; Singh et al., 1995; Gooding et al., 1998) konnte für PTB die Regulation des alternativen Spleißens im α -Tropomyosin-Gen humaner Zelllinien bestätigt werden. Raver1 zeigte in beiden Zelllinien denselben Effekt, weshalb die Daten insgesamt für eine co-repressive Wirkung von Raver1 auf das PTB-vermittelte Spleißen des α -Tropomyosin-Gens sprechen.

3.3.2.2 c-src

Eine direkte Beteiligung von PTB am alternativen Spleißen von c-src in HeLa- und HEK-Zellen wurde bereits in früheren Analysen gezeigt: Sowohl Minigen-Analysen in HEK-Zellen als auch *in vitro* Versuche mit HeLa-Kernextrakten belegten eine PTB-vermittelte Repression des neuronalen N1-Exons des c-src-Gens (Chan & Black 1997, Modafferi & Black 1997). In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der qPCR-Analysen an siRNA-behandelten HeLa- und HEK-Zellen gezeigt. Der „knock down“ von PTB bewirkt in beiden Zelllinien eine drastische, statistisch signifikante Zunahme an inkorporiertem N1-Exon in die mRNA (Abbildung 40 A). Die repressive Wirkung von PTB auf die Integration des N1-Exons konnte somit auch für endogene Spleißprozesse in intakten Zellen bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wird die nicht-neuronale Isoform durch den „knock down“ von PTB nicht wesentlich beeinflusst. Ein völlig anderes Bild ergab sich für qPCR-Analysen nach siRNA-vermitteltem „knock down“ von Raver1. Der Duplex R1siRNA1 führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Transkriptmenge im Vergleich zu den HK-Genen (Abbildung 40 B). Auch die neuronale Variante zeigte eine generell niedrigere Expression. Ein ähnlicher Effekt war bereits in Herz, Uterus und Lunge beobachtet worden (siehe Abbildung 36). Auch für den Duplex R1siRNA2 wurde eine tendenzielle Abnahme der neuronalen Spleißvariante verzeichnet, die jedoch nur in HEK-Zellen signifikant war (Abbildung 40 C). Eine Reduktion der Gesamt-Transkriptmenge wurde für R1siRNA2 nicht beobachtet.

Insgesamt deuten die siRNA-Analysen darauf hin, dass Raver1 in den untersuchten Zelllinien keinen verstärkenden, also co-repressiven Einfluss auf die PTB-vermittelte Repression des N1-Exons des c-src-Gens nimmt. Allerdings bestätigen zumindest die Daten für R1siRNA1 zugleich die bereits in Raver1-KO-Mäusen beobachtete Abnahme der Gesamt-Transkriptmenge.

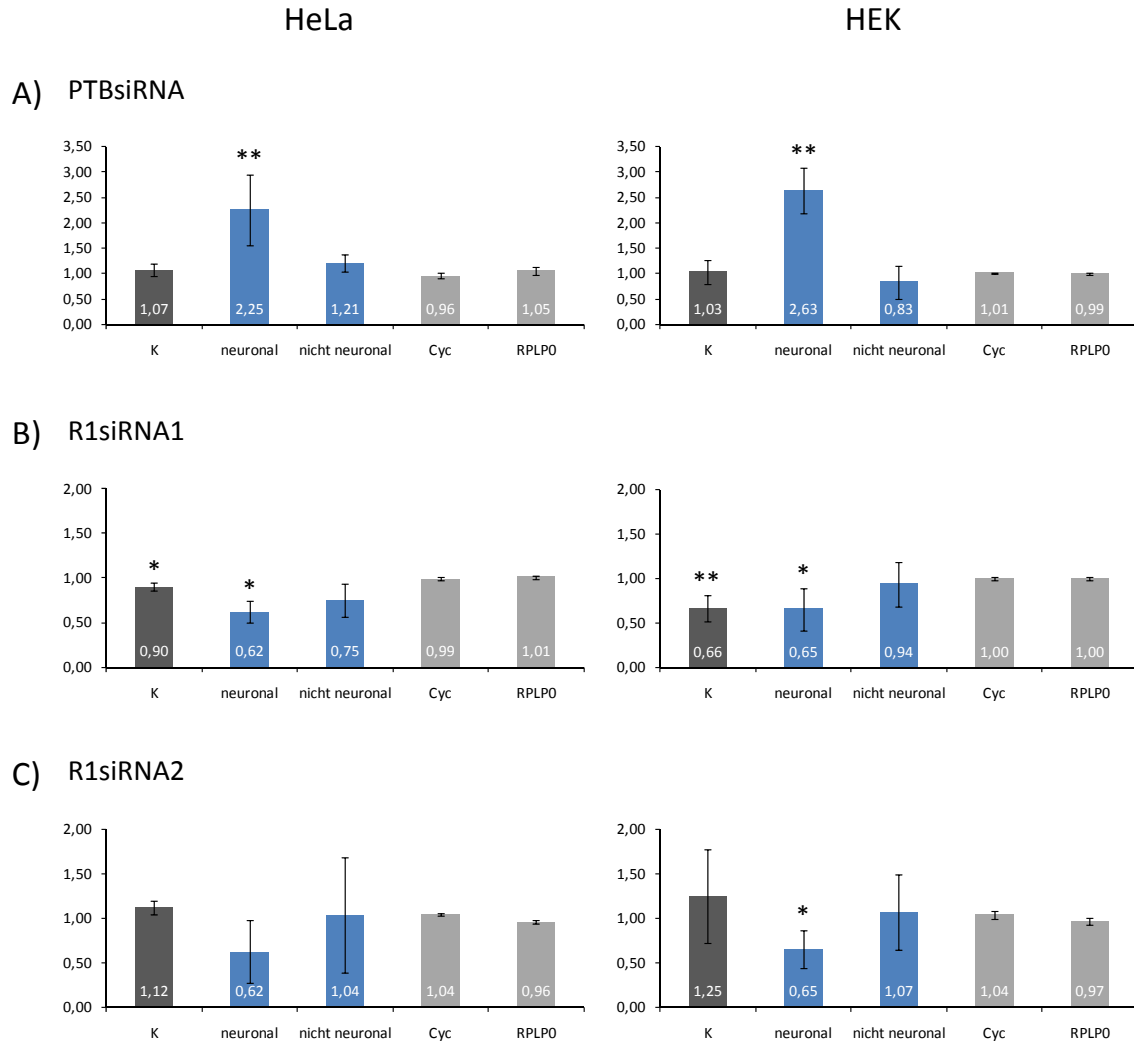


Abbildung 40: Der spezifische „knock down“ von PTB führt zu einer verstärkten Inkorporation des neuronalen N1-Exons in die c-src-mRNA. QPCR-Analysen des PTB- und Raver1-„knock down“ in HeLa- (links) und HEK-Zellen (rechts) für das c-src-ExonN1. (A) Beeinflussung des alternativen Spleißens von c-src-ExonN1 (neuronal/ nicht-neuronal) durch den „knock down“ von PTB in HeLa-Zellen (n=5) und HEK-Zellen (n=4). (B) Spleißverteilung der alternativen c-src-Isoformen durch Behandlung mit Raver1-siRNA1 (R1siRNA1) in HeLa- (n=4) und HEK-Zellen (n=6). (C) Relative Anteile der c-src-Spleißvarianten durch die Raver1-siRNA2 (R1siRNA2) in HeLa-(n=4) und HEK-Zellen (n=6). K= interne Kontrolle im konventionell gespleißten Bereichs der c-src mRNA. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

3.3.2.3 FGF-Rezeptor2

Die *in vivo* Spleiß-Analysen des FGF-Rezeptor2 (FGF-R2) an Raver1-defizienten Mäusen hatten vor allem in den initialen Untersuchungen die deutlichsten Unterschiede in den Spleißverhältnissen zwischen Raver1-KO-Mäusen und Wildtyp-Tieren gezeigt (siehe Abbildung 34 C). Darüber hinaus wurden stark gewebespezifische Unterschiede ermittelt: Während im Hirn Verschiebungen in beiden Isoformen (epithelial und mesenchymal) beobachtet wurden, die der Co-Repressor Theorie entsprechen, wurde in Darm und Lunge genau der gegenteilige, aber ebenso signifikante Effekt nachgewiesen. Somit war die Verwendung von Zelllinien mit epithelialem Ursprung (HeLa- und HEK-Zellen) besonders geeignet, um gerade in diesem Zelltypus die epitheliale Isoform des FGF-R2 zu analysieren. Die Ergebnisse der Spleiß-Analysen in beiden humanen Zelllinien sind in Abbildung 41 dargestellt.

In HeLa-Zellen konnte zunächst die beschriebene repressive Wirkung von PTB auf die epitheliale Isoform (Carstens et al., 2000) bestätigt werden, da es nach dem siRNA-vermittelten „knock down“ von PTB in den Zellen zu einer leicht signifikant erhöhten Inkorporation des ExonIIIb (Abbildung 41 A, links) kam. Gleichzeitig nimmt die mesenchymale Spleißvariante ab. In HEK-Zellen war zwar keine signifikante Verschiebung der epithelialen Isoform zu beobachten, die Inkorporation der mesenchymalen Isoform durch den „knock down“ von PTB nimmt jedoch signifikant ab (Abbildung 41 A, rechts). Diese Daten stimmen mit vorherigen Untersuchungen überein, in denen durch einen gezielten „knock down“ von PTB ebenfalls nur geringe Verschiebungen der Spleißvarianten in HEK-Zellen beobachtet wurden (Wagner & Garcia-Blanco, 2002). Die bereits für PTB beobachteten, wenn auch nur leichten Verschiebungen zugunsten der epithelialen Variante nach siRNA-vermitteltem PTB-„knock down“, konnten prinzipiell auch nach gezieltem „knock down“ von Raver1 beobachtet werden. Der Duplex R1siRNA1 führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der mesenchymalen (IIIc) Spleißvariante (Abbildung 41 B). Für R1siRNA2 ist diese Abnahme lediglich in HEK-Zellen zu beobachten (Abbildung 41 C, rechts).

Generell konnte durch den „knock down“ des Raver1-Proteins keine signifikante Erhöhung der epithelialen IIIb-Variante beobachtet werden. Zwar zeigen R1siRNA1-behandelte HeLa-Zellen eine ähnliche leichte Erhöhung der ExonIIIb-Inkorporation in die mRNA wie beim siRNA-vermittelten PTB-„knock down“, allerdings ist diese durch die höhere Streuung der Datenpunkte nicht signifikant. Kritisch betrachtet zeigt zwar der „knock down“ von PTB,

nicht aber der von Raver1 den erwarteten Effekt, dass wenn der mögliche co-repressive Einfluss von Raver1 fehlt oder vermindert ist, es zu einer verstärkten Inkorporation des epithelialen IIIb-Exons kommt. Somit konnte die Co-Repressor-Funktion von Raver1 am alternativen Spleißen des FGF-R2 nicht eindeutig bestätigt werden.

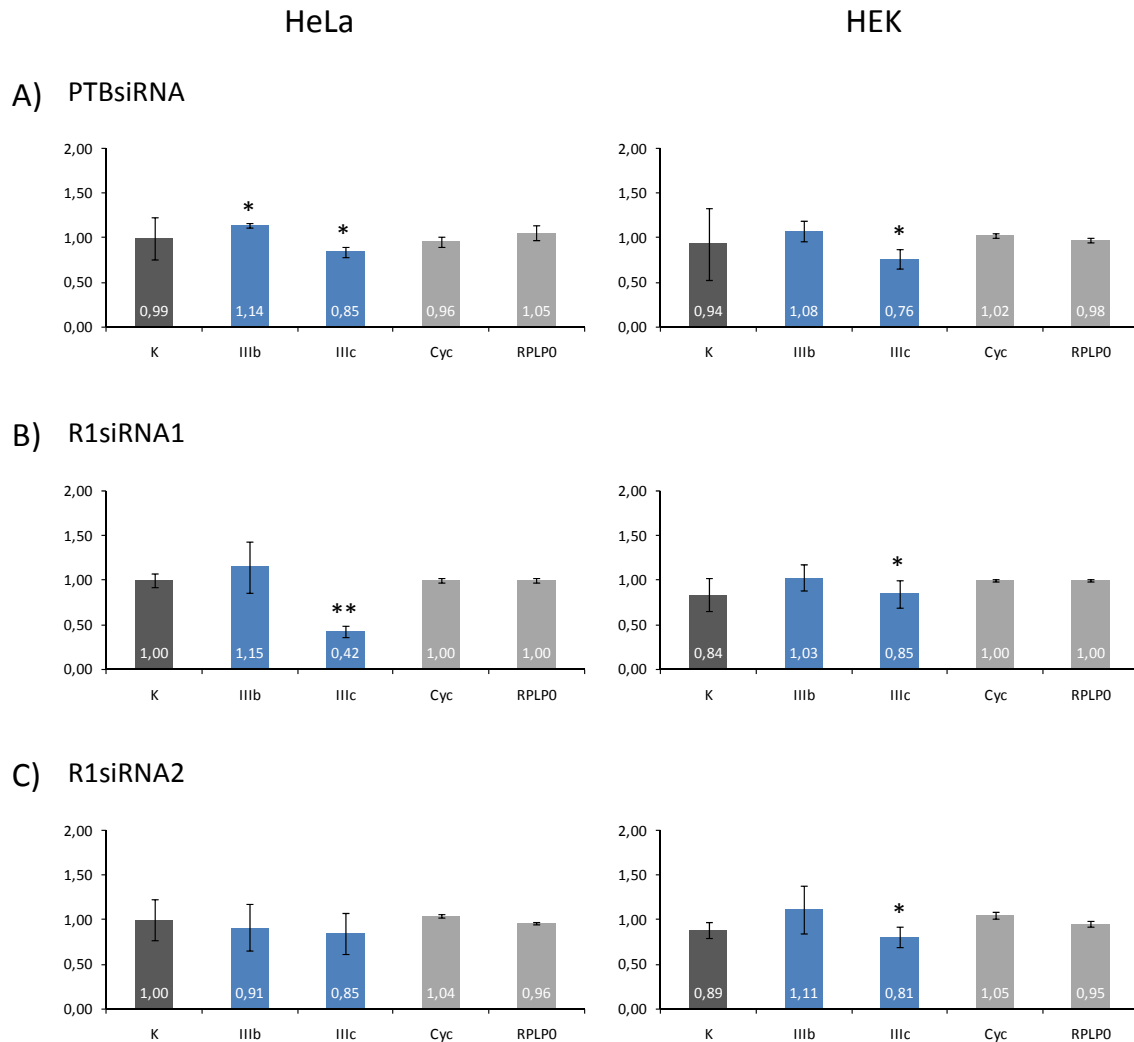


Abbildung 41: Der „knock down“ von Raver1 zeigt keinen direkten Einfluss auf das alternative Spleißen des FGF-Rezeptor2 in HeLa- und HEK-Zellen. QPCR-Analysen des PTB- und Raver1-„knock down“ in HeLa- (links) und HEK-Zellen (rechts) für das alternative Spleißen des FGF-R2. (A) Beeinflussung des alternativen Spleißens des FGF-R2-ExonIIIb (mesenchymal) und -ExonIIIc (epithelial) durch den „knock down“ von PTB in HeLa-Zellen (n=5) und HEK-Zellen (n=4). (B) Spleißverteilung der FGF-R2-Isoformen durch die Behandlung mit Raver1-siRNA1 (R1siRNA1) in HeLa-(n=4) und HEK-Zellen (n=6). (C) Relative Anteile der FGF-R2-Spleißvarianten durch die Raver1-siRNA2 (R1siRNA2) in HeLa-(n=4) und HEK-Zellen (n=5). K= mRNA-Kontrolle im nicht-alternativ gespleißten Bereich des FGF-R2. Cyc und RPLP0 bezeichnen die zur Kreuznormalisierung verwendeten „Housekeeping-Gene“. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

3.3.3 Vergleichende Betrachtung der Korrelation zwischen initialer relativer Verteilung alternativer Spleißvarianten und den beobachteten Verschiebungen im Spleißverhältnis nach negativer Modulation der Raver1-Expression

Die vorangegangenen qPCR-Analysen haben gezeigt, dass eine Modulation der Raver1-Expression tatsächlich Einfluss auf das Spleißverhältnis einiger durch PTB-vermittelten alternativer Spleißprozesse nimmt. Allerdings waren weder alle Zielgene von PTB gleichermaßen betroffen, noch konnten die Beobachtungen einheitlich mit der Co-Repressor-Theorie in Einklang gebracht werden. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Analysen nur die signifikante Verschiebung einer Isoform beobachtet werden, während die komplementäre Variante unverändert blieb. Bei rein theoretischer Betrachtung wäre zunächst erwartet worden, dass bei gleicher Transkriptmenge die Verschiebung einer Spleißvariante auch eine entgegengesetzte Veränderung des alternativen Spleißproduktes zur Folge hätte. Allerdings ist hierbei zu bedenken, dass alle Daten dieser Arbeit nur auf relative Veränderungen bezogen sind. Das bedeutet, dass unter Umständen die initiale Verteilung zweier Spleißvarianten einen Einfluss auf die zu beobachtenden Spleißverschiebungen nimmt: Kleine Verschiebungen in der Spleißaktivität sollten sich beispielsweise stärker bemerkbar machen, je geringer die Expressionsstärke der Isoform im entsprechenden Gewebe oder in den Zellen ist. Im Folgenden wurde daher versucht, eine Korrelation zu finden zwischen der relativen Expression zweier alternativer Spleißprodukte im Wildtyp und die durch Modulation der Raver1-Expression hervorgerufenen Veränderung. Zur besseren Übersicht sind daher noch einmal alle Raver1-relevanten Analysen in Tabelle 5 zusammengefasst:

Im Kopf der Tabelle sind die sechs Gene aufgelistet, für die eine erste Analyse in Hirn und Darm durchgeführt wurde. Die anschließenden Untersuchungen für die weiteren murinen Gewebe und humanen Zelllinien wurden lediglich für α -Tropomyosin, FGF-R2 und c-src durchgeführt. Im unteren Bereich der Tabelle sind die Analysen dieser drei Gene in HeLa- und HEK-Zellen aufgelistet, in denen durch die Verwendung der R1siRNA1 und R1siRNA2 die Expression des Raver1-Proteins unterdrückt wurde. Die Tabelle bezieht sich jeweils nur auf die zwei untersuchten alternativen Spleißvarianten jedes Gens. Dabei deuten die verwendeten Pfeile auf einen Anstieg (\uparrow) oder die Abnahme (\downarrow) der Isoform in den Raver1-KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp hin. Die Anzahl der Pfeile stellen hierbei jeweils die Signifikanz der Veränderung durch Verwendung des T-Tests dar ($\uparrow < 0,05$, $\uparrow\uparrow < 0,005$, $\uparrow\uparrow\uparrow < 0,0005$). Diese sind somit kein direktes Maß für die tatsächliche Verschiebung, so dass aus einer hohen Signifikanz nicht zwangsweise auch eine starke

Verschiebung in der Verteilung der Spleißvarianten erfolgt sein muss, auch wenn beides miteinander korrelieren kann.

Wie bereits erwähnt konnten nicht nur signifikante Verschiebungen in beiden Spleißvarianten zwischen Raver1-KO-Mäusen und Wildtyp-Tieren beobachtet werden, die einer Co-Repressor-Theorie für Raver1 entsprechen würde (grün unterlegt). Für den FGF-R2 wurden zum Teil hochsignifikante Verschiebungen gemessen, die dieser Theorie diametral gegenüberstehen (orange unterlegt). Der in Tabelle 5 verwendete Farbcode liest sich wie folgt: Dunkelgrün unterlegte Felder bedeuten, dass für dieses Gen beide alternativ gespleißten Isoformen eine relative Verschiebung erfahren, die der Co-Repressor-Theorie entspricht. Hellgrüne Felder identifizieren Analysen, bei denen nur eine Spleißvariante eine Theorie-konforme Veränderung aufweist, das alternative Spleißprodukt jedoch unverändert bleibt (0). Intensivorange Felder weisen auf eine der Co-Repressor-Theorie widersprechenden Verschiebung beider Spleißvarianten hin, die zudem immer signifikant gegenüber den Kontrollgenen sind. Hellorange wurden Analysen gekennzeichnet, bei denen nur eine Isoform eine der Theorie entgegengesetzte Verschiebung zeigte, die andere jedoch unbeeinflusst blieb. Die grau unterlegten Felder der c-src-Analysen kennzeichnen die Reduktion einer oder beider alternativer Isoformen, welche in Zusammenhang mit einer verringerten Gesamt-RNA Menge des Gens steht (dunkelgrau) oder nur tendenziell von dieser abhängig zu sein scheint (hellgrau).

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der durch Raver1-vermittelten Spleißverschiebungen in murinen Geweben und humanen Zellen.

Zielgen		α -Tropomyosin		α -actinin		FGF-R2		GABA-R γ 2		c-src		PTB	
Isoform		NM	SM	NM	SM	IIIb	IIIc	neuronal	nicht neuronal	neuronal	Nicht neuronal	PTB	PTBtr
murine Gewebe	Hirn	0	0	0	0	↑↑↑	↓↓↓	0	0	0	0	0	0
	Darm	0	0	↓	↑↑	↓↓↓	↑	n.n.	0	↑↑↑	0	0	0
	Herz	0	↓↓↓			↓↓↓	0			↓↓*	↓↓*		
	Uterus	0	↓			(↓)	0			(↓)	(↓)		
	Lunge	↑	↓			↓	↑			↓*	↓*		
humane Zellen	HeLa R1siRNA1	↑	↓↓			0	↓↓			↓	(↓)		
	HeLa R1siRNA2	(↑)	0			0	0			(↓)	0		
	HEK R1siRNA1	0	↓↓			0	↓			↓	0		
	HEK R1siRNA2	(↑)	(↓)			0	↓			↓	0		

↑-↑↑↑ = erhöhte Expression der Isoform in den murinen Raver1-KO-Geweben/ -KD-Zellen (Signifikanz-Grade: ↑=0,05; ↑↑=0,005; ↑↑↑=0,0005)

↓-↓↓↓ = verringerte Expression der Isoform in den murinen Raver1-KO-Geweben/ -KD-Zellen (Signifikanz-Grade: ↓=0,05; ↓↓=0,005; ↓↓↓=0,0005)

0 = gleichbleibende Expression der Isoform zwischen KO-Geweben/KD-Zellen und den entsprechenden Wildtypen

n.n. = nicht nachweisbare Isoform

() = tendenzielle Verschiebungen, jedoch ohne statistische Signifikanz

 = Co-Repressor mit Auswirkung auf beide Isoformen

 = entgegen der Co-Repressor Theorie mit Auswirkung auf beide Isoformen

 = Co-Repressor mit Auswirkung auf eine Isoform

 = entgegen der Co-Repressor Theorie mit Auswirkung auf eine Isoformen

 = verringerte Expression steht im Zusammenhang mit verringerter Gesamt-RNA Menge des Gens

 = verringerte Expression steht in keinem eindeutigen Zusammenhang mit verringerter Gesamt-RNA Menge des Gens

Zusammenfassend lässt sich aus den in Tabelle 5 gelisteten Daten feststellen, dass die Gene GABA-R γ 2 und PTB in den untersuchten Geweben Hirn und Darm durch den „knock out“ von Raver1 unverändert bleiben. Für α -actinin wurde eine der Co-Repressor-Theorie von Raver1 entsprechende Verschiebung im Darm beobachtet, allerdings konnte das Zielgen aus technischen und zeitlichen Gründen im Rahmen der Arbeit nicht in weiteren Geweben untersucht werden (siehe Ausblick: Kapitel 4.4).

Obwohl für α -Tropomyosin in den initialen Analysen von Hirn und Darm keine Verschiebung beobachtet wurde, weisen sowohl die Untersuchungen von Herz, Uterus und Lunge, als auch die zellulären Analysen mittels siRNA-vermitteltem „knock down“ darauf hin, dass Raver1 in der Tat ein Co-Repressor von PTB für dieses Gen zu sein scheint.

Die Gewebespezifität von alternativen Spleißprozessen zeigte sich vor allem in den Analysen des FGF-R2. Während die Untersuchungen auf Hirngewebe eindeutig die Co-Repressor-Theorie unterstützen und auch die Daten für HeLa- und HEK-Zellen eher dieses Modell favorisieren, führte die Inaktivierung des Raver1-Gens vor allem in Darm und Lunge aber auch in Herz und Uterus zu einer derartigen Verschiebung der alternativen Spleißvarianten, die in direktem Widerspruch zu der Co-Repressor-Theorie stehen. Eine einheitliche und somit zumindest für das Spleißen des FGF-R2-Gens eindeutige Funktion als Co-Repressor von PTB kann Raver1 somit nicht zugeschrieben werden.

Einen Sonderfall stellen die Daten des c-src-Gens dar, denn während im Darm die analysierten Verschiebungen zumindest in der Tendenz die Co-Repressor-Theorie bestätigten, wurde vor allem in Herz und Lunge eine starke Abnahme der Gesamt-Transkriptmenge beobachtet (dunkelgrau unterlegt), die sich auch zumindest tendenziell im Uterus widerspiegelte (hellgrau unterlegt). Ähnliche Tendenzen zeigten die Analysen des c-src-Gens in den humanen Zelllinien HeLa und HEK, in denen es vor allem durch die Verwendung der R1siRNA1 zu einer signifikanten Abnahme der Gesamt-Transkriptmenge kam. Eine die Transkription modulierende Funktion von Raver1 ist jedoch bisher nicht beschrieben worden (siehe Ausblick Kapitel 4.4).

In Tabelle 5 wurden auch die Analysen in Bezug auf die postulierte Co-Repressor-Theorie einbezogen, bei denen nur eine Spleißvariante eine Verschiebung zeigte. Grundlage hierfür ist unter anderem, dass wie bereits erwähnt bei einer Darstellung relativer Mengen kleinere Verschiebungen von wenigen Prozenten sich eher bemerkbar machen können, je geringer der Anteil dieser Spleißvariante bereits im Wildtyp ist. Die relative Darstellung der in Tabelle 5 gezeigten qPCR-Analysen erlaubt jedoch keine Aussage über das ursprüngliche Mengenverhältnis zweier Isoformen eines Gens zueinander. Das ursprüngliche

Mengenverhältnis kann aber tendenziell mittels konventioneller PCR dargestellt werden und ist exemplarisch für den FGF-R2 in HeLa- und HEK-Zellen in Abbildung 42 (links) gezeigt. Dabei wurde die aus HeLa- und HEK-Zellen generierte cDNA als Template für eine konventionelle PCR verwendet. Die Amplifikation der FGF-R2-Spleißvarianten erfolgte durch die Primer hFGF_epi_s und hFGF_epi_r für die epitheliale Isoform sowie die Primer hFGF_mes_s und hFGF_mes_r für die mesenchymale Spleißvariante (siehe Anhang Tabelle 7). Nach Auftrennung der PCR-Produktbanden im Agarosegel, konnte die Intensität der Banden densitometrisch mit Hilfe des Programms E.A.S.Y.[®] Win32 (Herolab) bestimmt werden. In HeLa-Zellen wurde so ein Verhältnis der epithelialen zur mesenchymalen Isoform von 94:6 ermittelt (Angaben in Prozent). Der Expressionsspiegel des epithelialen FGF-R2 liegt demnach in HeLa-Zellen deutlich über dem des mesenchymalen FGF-R2. Die Bandenintensitäten der Isoformen in HEK-Zellen zeigten dagegen ein nahezu gleiches Mengenverhältnis für die Integration des IIIb- (44%) und IIIc-Exons (56%) in die mRNA.

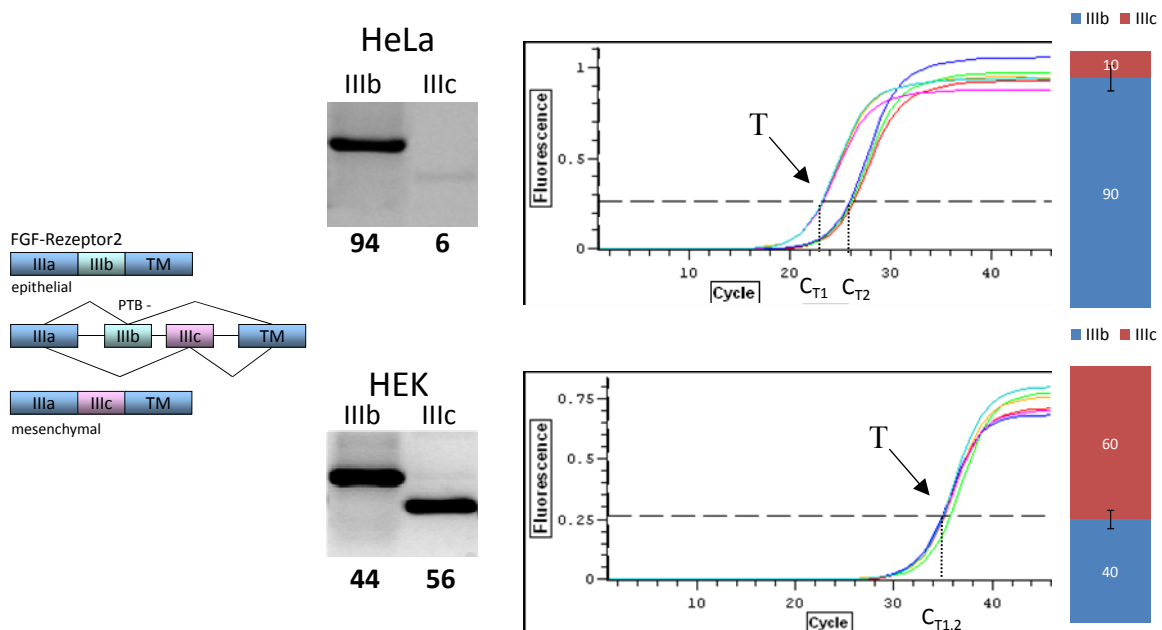


Abbildung 42: Mengenverhältnisse der epithelialen und mesenchymalen Isoform des FGF-R2 in HeLa- und HEK-Zellen. Die schematische Darstellung des PTB-vermittelten Spleißprozesses ist links gezeigt. Zur Bestimmung der Expressionsverhältnisse der FGF-R2-Spleißvarianten wurden je 1 µl generierte cDNA (hier aus Wildtyp HeLa- und HEK-Zellen) als Template für die konventionelle PCR verwendet. Die PCR-Produkte der epithelialen (IIIb) und mesenchymalen (IIIc) Isoform wurden im 3%-igen Agarosegel aufgetrennt und die Bandenintensität densitometrisch ausgewertet (Mitte). Die Zahlen unter den Gelausschnitten zeigen die relative Verteilung der FGF-R2-Isoformen in Prozent nach densitometrischer Auswertung. Im den Amplifikations-Plots (rechts) sind die Zyklen der quantitativen PCR gegen die ansteigende Fluoreszenz aufgetragen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet dabei die Fluoreszenzintensität zum Erreichen des Schwellenwertes (T="Threshold"). Ganz rechts sind die Mengenverhältnisse beider Isoformen dargestellt, die anhand der qPCR-Rohdaten errechnet wurden (Details siehe Text).

Eine differenziertere Analyse der Expression erlauben so genannte „Amplifikationsplots“, bei denen sich aus der Korrelation zwischen Fluoreszenzanstieg und Zyklenzahl im linearen Bereich das relative Mengenverhältnis zweier Templates berechnen lässt (Abbildung 42, rechts). In den Amplifikationsplots sind jeweils insgesamt sechs Kurven dargestellt, von denen jeweils drei (dunkelgrün, gelb, rosa) den drei parallel durchgeführten qPCRs für die epitheliale Isoform (IIIb) entsprechen. Die weiteren drei Kurven (hellgrün, blau, rot) stellen die Amplifikation der mesenchymalen Variante (IIIc) in drei Parallelansätzen derselben Versuchsreihe dar. Entscheidend bei der Ermittlung der Expressionsstärken ist der Schnittpunkt der Kurven mit dem Schwellenwert (Threshold (T), gestrichelte Linie) in der exponentiellen Phase der Reaktion. Bereits ohne Berechnung ist aus beiden Plots deutlich zu erkennen, dass die Analysen in HeLa- und HEK-Zellen dabei Unterschiede aufweisen. Die Analysen der HeLa-Zellen zeigen zwei Schnittpunkte, wobei die Kurven der ExonIIIb-Amplifikation bereits nach ca. 23 Zyklen (C_{T1}), die ExonIIIc-Kurven erst nach ca. 26 Zyklen (C_{T2}) den Schwellenwert überschreiten. Im Gegensatz dazu ist aus dem Amplifikationsplot der HEK-Zellen nur ein gemeinsamer Schnittpunkt ($C_{T1,2}$) für alle Kurven erkennbar. Dies deutet bereits darauf hin, dass in HeLa-Zellen deutlich mehr epitheliales FGF-R2 als Template vorliegt, da dieses entsprechend früher in den qPCR-Analysen amplifiziert wird, während in HEK-Zellen annähernd gleiche Template-Mengen beider Isoformen vorhanden sind.

Zur Berechnung der relativen Expression wurden die Zyklus-Zeitpunkte (C_T) der zu untersuchenden Proben miteinander verglichen (prozentuale Angaben). Zur Berechnung wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{Isoform1 [\%]} = ((100 * (2^{(C_{T \text{ Iso1}} - C_{T \text{ Iso2}})})) * 100) / (100 * (2^{(C_{T \text{ Iso1}} - C_{T \text{ Iso2}})}) + 100)$$

$$\text{Isoform2 [\%]} = 100 - \text{Isoform1 [\%]}$$

$C_{T \text{ Iso1}}$ stellt in der Formel den Zyklus-Zeitpunkt dar, in dem die Isoform1 den Schwellenwert (T) übersteigt, während $C_{T \text{ Iso2}}$ das Äquivalent zur Isoform2 ist.

In HeLa-Zellen konnte so ein Mengenverhältnis von 90% zu 10% zwischen epithelialer und mesenchymaler Isoform errechnet werden. HEK-Zellen zeigten ein Expressionsverhältnis von 40% (IIIb) zu 60% (IIIc). Durch die errechneten Werte aus den qPCR-Daten konnte somit ein ähnliches Mengenverhältnis für die Isoformen ermittelt werden, wie durch die Ermittlung der densitometrischen Auswertung. Die Densitometrie von konventionellen PCR-Produkten birgt jedoch gewisse Risiken. Es kann nicht gewährleistet werden, dass die Amplifikation der DNA durch die verwendete Zyklenzahl sich am Ende der Reaktion noch in der exponentiellen

Phase befindet. Messungen in der Sättigungsphase der Reaktion würden demnach zu verzerrten Ergebnissen führen. In quantitativen PCRs kann dieser Fehler weitestgehend ausgeschlossen werden. Allerdings muss auch hier darauf hingewiesen werden, dass in der vorliegenden Arbeit bei der Berechnung der Mengenverhältnisse mittels qPCR auf die Bestimmung der Primer-Effizienz verzichtet wurde. In der zur Berechnung verwendeten Formel wurde somit eine theoretische Effizienz von 100% angenommen (Pfaffl et al., 2001). Die hier errechneten Werte der Expressionsverhältnisse stellen daher keine absoluten Prozente dar, sondern sind als Näherungswerte der Mengenverhältnisse zu verstehen. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Schmelzkurven ließ sich trotzdem für die in dieser Arbeit analysierten Gene eine relative Verteilung der Isoformen abschätzen.

In Tabelle 6 sind diese Näherungswerte der Mengenverhältnisse von den untersuchten Isoformen aller analysierten Zielgene dargestellt, die sowohl in humanen Zellen als auch in murinem Gewebe alternativ gespleißt werden. Wie in Tabelle 5 bezieht sich Tabelle 6 jeweils nur auf die zwei untersuchten alternativen Spleißvarianten jedes Gens. Die Mengenverhältnisse beider Isoformen sind unter den untersuchten Zielgenen im Kopf der Tabelle als Balken dargestellt. Dabei entspricht ein Kästchen des Balkens einer Expression von 10% der entsprechenden Isoform im Vergleich zur alternativen Spleißvariante. Blau unterlegte Kästchen stehen für die Expressionsstärke der im Kopf dargestellten linken Isoform des betreffenden Gens, während orange Felder die Expression der rechten Isoform kennzeichnen. Bereits aus dem Farbcode ist eindeutig zu erkennen, dass die untersuchten Spleißvarianten stark zwischen den einzelnen Geweben variieren. In den meisten Fällen wird dabei eine der beiden Isoformen stark bevorzugt. Im Darm konnte für den GABA-R γ 2 sogar ausschließlich die nicht-neuronale Variante nachgewiesen werden. Anhand dieser Verteilung wurde nun noch einmal überprüft, in wie weit die beobachteten (und in Tabelle 5 zusammengefassten) Spleißverschiebungen in Raver1-defizienten Mäusen und Zelllinien mit der Expressions-Hypothese korrelieren, dass kleine Verschiebungen sich eher bei einer unterrepräsentierten Isoform bemerkbar machen. Vergleicht man daher die Ergebnisse der Spleißverschiebungen aus Tabelle 5 mit den Expressionsverhältnissen der Tabelle 6, so trifft die Hypothese einer stärkeren Verschiebung auf Grund niedrigerer Expressionsstärke nur bedingt zu. Das alternative Spleißen des N1-Exons von c-src im Darm unterstützt die Expressions-Hypothese, da es hier ausschließlich zu einer hochsignifikanten Verschiebung der gering exprimierten neuronalen Isoform kommt, während die stark exprimierte nicht-neuronale Isoform keine Verschiebung aufweist. Auch beim α -Tropomyosin wird jeweils im Herz sowie in HEK-Zellen nur die schwächer exprimierte Isoform (SM) verschoben, was

ebenfalls die Hypothese unterstützt, während in der Lunge und in HeLa-Zellen trotz differenzierter Expression des NM- und SM-Exons beide Isoformen proportional verschoben werden und somit scheinbar unabhängig von der Expressionsstärke gespleißt werden. Entgegengesetzt verhält sich die Verschiebung der α -Tropomyosin-Isoformen im Uterus, wo trotz stärkerer Expression des SM-Exons nur diese Spleißvariante in den Raver1-KO-Mäusen eine Verschiebung erfährt, wohingegen das geringer exprimierte NM-Exon unverändert bleibt. Es ist also davon auszugehen, dass die initiale Expressionsstärke zweier alternativer Spleißvarianten nicht das einzige Kriterium für eine fehlende inverse Proportionalität in der relativen Verschiebung des Spleißens zweier Isoformen ist.

Tabelle 6: Aus Amplifikationsplots ermittelte relative Verteilung der Isoformen in Wildtyp-Geweben und Wildtyp-Zelllinien.

Zielgen		α -Tropomyosin		α -actinin		FGF-R2		GABA-R γ 2		c-src		PTB	
Isoform		NM	SM	NM	SM	IIIb	IIIc	neuronal	nicht neuronal	neuronal	nicht neuronal	PTB	PTBtr
murine Gewebe	Hirn												
	Darm												
	Herz												
	Uterus												
	Lunge												
humane Zellen	HeLa												
	HEK												

Ein Quadrat der in blau und orange dargestellten Isoformen besitzt einen Näherungswert von etwa 10%.

☆: Für den GABA-R γ 2 konnte in murinem Darmgewebe weder in Raver1-KO-Mäusen noch in den Wildtyp-Mäusen die neuronale Isoform mittels qPCR detektiert werden.

3.3.4 Untersuchungen zum alternativen Spleißen des Fas-Rezeptors-Gens *in vivo* und anhand von Minigenen

Die im vorigen Kapitel beschriebenen *in vivo* Verschiebungen im Spleißverhältnis der PTB-Zielgene α -Tropomyosin, c-src und FGF-R2 nach Inaktivierung des Raver1-Gens lassen sich nicht alle durch die Co-Repressor-Theorie erklären. So konnte beispielsweise in der vorliegenden Arbeit die co-repressive Wirkung von Raver1 auf das PTB-vermittelte Spleißen des FGF-R2-Gens (Carstens et al., 2000) nicht in allen *in vivo* untersuchten Mausgeweben festgestellt werden. Somit widersprechen diese Daten den erwarteten Ergebnissen, dass die meist durch Minigene identifizierte Repressor-Funktion PTB (Wagner et al., 2005) durch Raver1 verstärkt wird. Bei den Analysen endogener Spleißprozesse bleiben die zellulären Konzentrationen an mRNA und den beteiligten Spleißfaktoren weitestgehend unbeeinflusst - mit Ausnahme des zu untersuchenden Proteins dessen Expression in der Regel unterdrückt wird. Im Gegensatz dazu wird bei Minigen-Analysen meist nur ein kurzer Abschnitt des Gesamt-Gens überexprimiert. Es kommt somit zu einer artifiziellen, selektiven Erhöhung eines speziellen Templates, das unter Umständen nur ein begrenztes Repertoire der beteiligten Spleißfaktoren rekrutieren kann. Darüber hinaus werden Minigene oftmals dahingehend modifiziert, dass Bindungsmotive in den flankierenden intronischen Sequenzen des Minigens für eine verbesserte Bindung des zu untersuchenden Proteins optimiert werden. Das Minigen wird somit unter Umständen besser von dem zu untersuchenden Protein gebunden als das entsprechende endogene Transkript. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist daher durchaus möglich, dass Minigen-Analysen nicht den physiologischen Zustand widerspiegeln. Um auch für die vorliegende Arbeit eventuelle Hinweise zu erhalten, wie stark Minigen-Analysen von endogenen Spleißprozessen abweichen können, wurden vergleichende Analysen am Fas-Rezeptor durchgeführt, da uns entsprechende Konstrukte freundlicherweise von Prof. J. Valcarcel (Barcelona, Spanien) zur Verfügung gestellt wurden.

Das humane Fas-Gen (Apo-1/CD-95) codiert für ein Typ1 Transmembran-protein, welches in Zellen Apoptose durch Binden des Fas-Liganden (FasL) vermittelt (Krammer et al., 1994; Nagata & Golstein, 1995). Durch alternatives Spleißen des Exon6 im Fas-Rezeptor-Gen kann neben der Membran gebunden Isoform auch eine lösliche Form des Rezeptors exprimiert werden (Abbildung 43, links). Die Repression des Exon6 erfolgt durch Binden von PTB an einen ESS („exonic splicing silencer“), wodurch die lösliche Form des Rezeptors vorrangig gebildet wird, die inhibierend auf den Fas-Signalweg wirkt (Izquierdo et al., 2005). Für dieses PTB-Zielgen wurden im Folgenden *in vitro* und *in vivo* Spleiß-Analysen auf Zellen und Geweben durchgeführt.

3.3.4.1 *In vitro* Spleiß-Analysen des Fas-Rezeptors durch Minigene

Für die Analysen des Fas-Rezeptors wurden Minigene verwendet, welche einen kurzen Abschnitt an intronischen und exonischen Sequenzen des alternativen Spleißbereichs des Fas-Rezeptors umfassten. Das Minigen 5-6-7 beinhaltet die Exone 5-7 und deren flankierende Introns. Ein weiteres mutiertes Minigen wurde verwendet, in welchem eine Substitution von Uridin zu Cytidin an der Position -20nt der 3'-Spleißstelle des Intron5 vorgenommen wurde. Dadurch wird die Bindungsstelle des PTB-Antagonisten TIA-1 mutiert, welches die Inkorporation des Exon6 in HeLa-Zellen begünstigt (Forch et al., 2000). Die Substitution von U-20C führt zu einer geringeren Integration des Exon6 in die mRNA des Minigens. Zunächst wurden jedoch beide Minigene in HeLa-Zellen transfiziert, um Aufschluss über das Spleißverhältnis in humanen Zellen zu erlangen. In Abbildung 43 B ist das Agarosegel der PCR-Analysen des Versuchs dargestellt. Die Amplifikation beider Isoformen in den PCR-Analysen erfolgt über Vektor-spezifische Primer (siehe Anhang Tabelle 7). Nach Transfektion des WT-Minigens (Fas) wird in HeLa-Zellen fast ausschließlich die Membran gebundene Isoform exprimiert, in der das Exon6 in die mRNA inkorporiert ist (Abbildung 43 B). Die Mutation der TIA-1-Bindungsstelle im Minigen, bewirkt ein erhöhtes „Skipping“ des Exon6, so dass verstärkt die lösliche Spleißvariante gebildet wird. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Ergebnissen überein (Izquierdo et al., 2005).

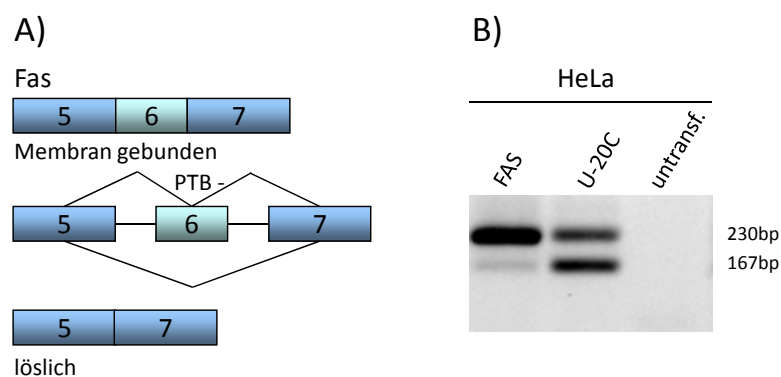


Abbildung 43: *In vitro* Spleiß-Analysen der Fas-Rezeptor mRNA in HeLa-Zellen. (A) Schematische Darstellung des alternativen Spleißprozesses des Fas-Rezeptors. PTB reprimiert das Exon6 und begünstigt so die lösliche Form des Rezeptors. (B) Zur Analyse der Spleißverhältnisse in HeLa-Zellen wurde das WT-Minigen (Fas) sowie das mutierte Minigen (U-20C) mittels MetafecteneTM transfiziert und die Spleißprodukte über konventionelle PCR mit spezifischen Primern in einem 3%-igen Agarosegel nachgewiesen. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet.

Darüber hinaus wurde in derselben Arbeitsgruppe (AG Valcarcel) Raver1 als möglicher Co-Repressor von PTB am alternativen Spleißen des Fas-Rezeptor-Exon6 identifiziert, wenn das Raver1-Protein aktiv an das Minigen rekrutiert wurde (Izquierdo et al., 2005). Diese aktive Rekrutierung erfolgte über das sogenannte MS2-System (Keryer-Bibens et al., 2008) bei dem das zu untersuchende Protein (Raver1) als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein des Bakteriophagen MS2 versehen wird, über welches dann eine Rekrutierung an das Minigen erfolgt. Letzteres beinhaltet in diesem System eine Erkennungssequenz für das MS2-Protein.

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob eine Modulation der Raver1-Expression in Mauszelllinien einen Effekt auf das alternative Spleißen der von Minigen transkribierten RNA hat. Als Testsystem wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF-Zellen) eingesetzt, die aus Wildtyp (WT) oder Raver1-defizienten Embryonen (MEFR1-KO) gewonnen worden waren (Dissertation B. Henneberg, 2006). Die Wildtyp-Zelllinie wt4227 sowie zwei Raver1-defiziente MEFR1-KO-Zellen (Hom1 und Hom3) wurden mit beiden Minigenen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Letztere diente als Template für konventionelle PCR-Analysen, bei denen über spezifische Primer selektiv die von dem Minigen-Template generierte RNA amplifiziert wurde.

In Abbildung 44 ist das Ergebnis dieser Analysen dargestellt. Für das WT-Minigen wurden zwei Transfektionsreagenzien eingesetzt (TransIT[®]-LT1, links und Metafectene[™], rechts). Zwischen den beiden Ansätzen konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten die Raver1-defizienten Zelllinien ein den Wildtyp-Zellen vergleichbares Spleißmuster. In allen Ansätzen wurde überwiegend die Membran-gebundene Form exprimiert. Im Vergleich zu den HeLa-Zellen weisen die Mauszellen jedoch bereits beim WT-Minigen auch einen deutlichen Anteil an der durch Exon-„Skipping“ generierten löslichen Isoform auf. Deren Anteil erhöht sich nur leicht bei Verwendung des modifizierten Minigens (Fas U-20C). Auch hier sind zwischen Wildtyp- und KO-Zelllinien keine Unterschiede zu erkennen.

MEF- und HeLa-Zellen weisen demnach ein unterschiedlich starkes Exon-„Skipping“ für dieselben Minigene auf, prinzipiell sind aber beide Zellsysteme in der Lage, die von den Fas-Minigen transkribierte RNA zu spleißen. Eine Beteiligung von Raver1 an diesen Prozessen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

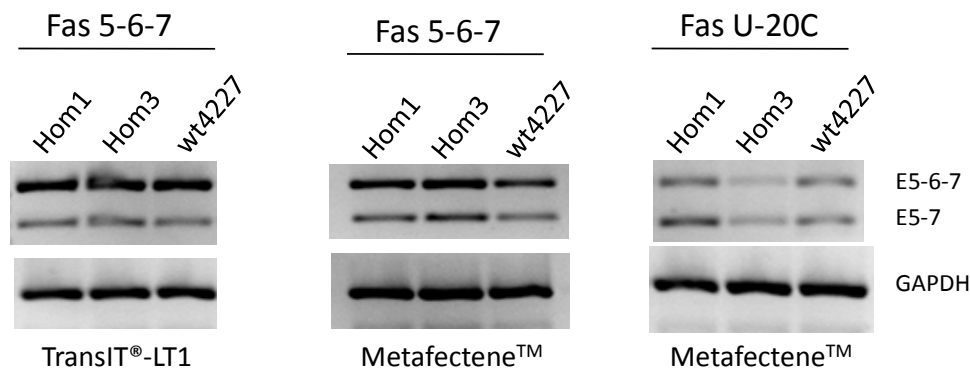


Abbildung 44: Das alternatives Spleißen des Fas-Rezeptors in MEFR1-KO-Zellen ist gegenüber den Wildtyp-Zellen unverändert. Die Minigene Fas 5-6-7 und Fas U-20C wurden in Raver1-defiziente Fibroblasten mittels TransIT®-LT1- (links) und Metafectene™-Transfektionsreagenz (Mitte und rechts) transfiziert. Nach 48h Inkubation wurde die RNA der Zellen isoliert. Daraus generierte cDNA wurde mit spezifischen Primern auf beide Fas-Isoformen analysiert und im 3%-igen Agarosegel ausgewertet. Die Verwendung gleicher Template-Mengen wurde durch Amplifikation von GAPDH gewährleistet.

3.3.4.2 Spleißmuster des Fas-Rezeptors in Raver1-defizienten Mäusen

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass das murine Spleißosom befähigt ist, humanes Fas-Rezeptor-Exon6 *in vitro* zu spleißen. Allerdings konnten aus Datenbank-Analysen bisher keine Hinweise auf alternative Spleißprozesse des Fas-Rezeptor Exon6 in murinen Strukturen entnommen werden. Durch vergleichende Analysen an Wildtyp- und Raver1-KO-Mäusen sollte nun überprüft werden, ob Exon6 des Fas-Rezeptors auch *in vivo* in Mausgeweben alternativ gespleißt wird. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse der qPCR-Analysen des Fas-Rezeptors auf verschiedenen murinen Geweben. Zusätzlich zu den bereits verwendeten Organen Herz, Uterus und Hirn wurde für den Fas-Rezeptor auch Milzgewebe analysiert, da der Rezeptor in diesem Gewebe stark exprimiert ist (Bridgham & Johnson, 2001). In keinem der untersuchten Gewebe konnte jedoch ein „Skipping“ des Exon6 festgestellt werden (Abbildung 45 A-D). In Mäusen scheint demnach die alternative Inkorporation des Fas-Rezeptor Exon6 nicht stattzufinden. Eine Ursache dafür könnte das Bindungsmotiv von PTB an die RNA sein. In humanen Zellen bindet PTB an die exonische Repressorsequenz URE6 (UCUUUCUUUCUU, Izquierdo et al., 2005). Dieser Sequenzabschnitt ist im murinen Fas-Rezeptor Exon6 nicht zu finden. Somit konnten die Datenbankanalysen bestätigt werden.

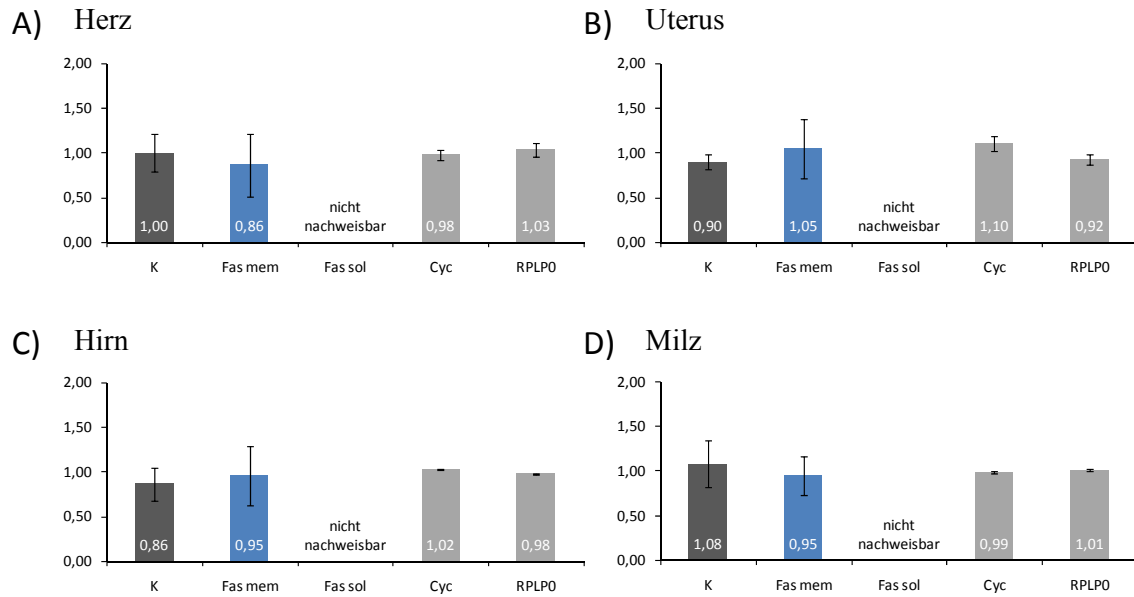


Abbildung 45: Das „Skipping“ des Fas-Rezeptor Exon6 kann in murinen Geweben nicht nachgewiesen werden. Die Balkendiagramme zeigen quantitative „real-time“-PCRs zur Analyse des Fas-Rezeptor Spleißens auf Herz, Uterus, Lunge und Milz in Raver1-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren. A) Alternatives Spleißmuster der Membran-gebundenen (Fas mem) und löslichen (Fas sol) Fas-Rezeptor-Isoform im Herz (n=5), im Uterus (B, n=3), in Lunge (C, n=4) und in der Milz (D, n=3) von Raver1-defizienten Mäusen. K= interne Kontrolle im konventionell gespleißten Bereich der Fas-Rezeptor mRNA. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

3.3.4.3 Modulation des alternativen Spleißens der Fas-Rezeptor mRNA in humanen Zelllinien durch RNA-Interferenz von PTB und Raver1

Da Mauszellen zwar prinzipiell in der Lage sind, das humane Fas-Rezeptor-Minigen zu spleißen, das entsprechende Maus-Gen die erforderliche Repressor-Sequenz jedoch nicht aufweist, konnten keine vergleichenden Studien zwischen Minigen-Versuchen und *in vivo* Analysen an Mäusen durchgeführt werden. Allerdings hatten bereits die Analysen in den Raver1-defizienten Mausfibroblasten gezeigt, dass das Fehlen von Raver1 keinen Einfluss auf die PTB-vermittelten Spleiß-Ereignisse des humanen Fas-Rezeptor-Minigen hat. Um nun zumindest einen Vergleich zwischen dem Minigen-System und endogenen Spleißvorgängen zu haben, wurden HeLa- und HEK-Zellen wie zuvor beschrieben (Kap. 3.3.2) mit spezifischen siRNAs transfiziert und das Spleißmuster des endogenen Fas-Rezeptor-Gens in beiden humanen Zelllinien analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 46 dargestellt.

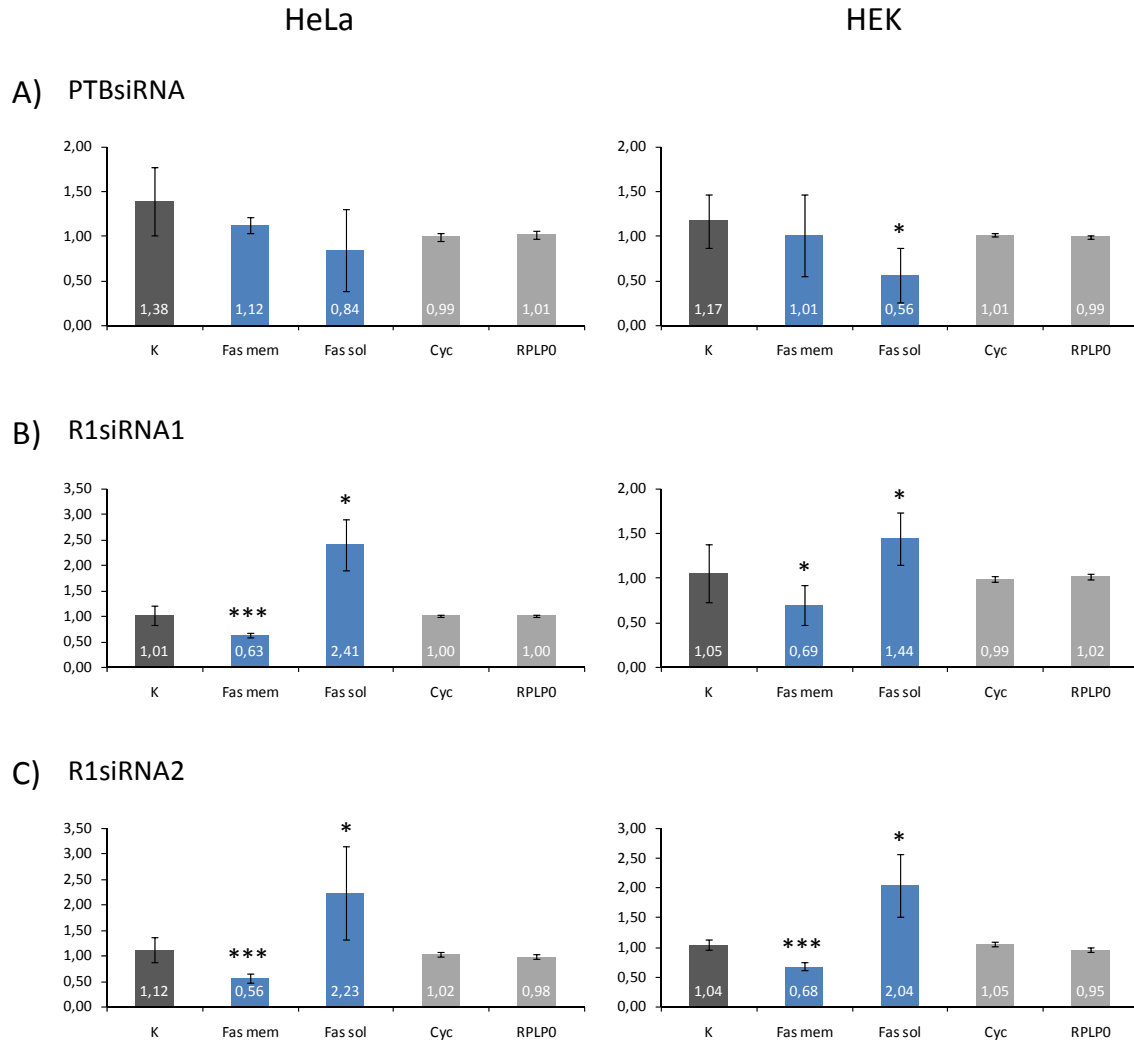


Abbildung 46: Raver1 zeigt keine co-repressive Funktion auf das alternative Spleißen des Fas-Rezeptor Exon6 in HeLa- und HEK-Zellen. QPCR-Analysen des PTB- und Raver1-„knock down“ in HeLa- (links) und HEK-Zellen (rechts) für das alternative Spleißen des Fas-Rezeptor. (A) Beeinflussung des alternativen Spleißens von Fas-Rezeptor Exon6 (Membran gebunden/ löslich) durch den „knock down“ von PTB in HeLa-Zellen (n=5) und HEK-Zellen (n=5). (B) Spleißverteilung der Fas-Rezeptor-Isoformen durch die die Behandlung mit Raver1-siRNA1 (R1siRNA1) in HeLa-(n=4) und HEK-Zellen (n=7). (C) Relative Anteile der Fas-Rezeptor-Spleißvarianten durch die Raver1-siRNA2 (R1siRNA2) in HeLa-(n=5) und HEK-Zellen (n=5). K= interne Kontrolle im konventionell gespleißten Bereich der Fas-Rezeptor mRNA. Als „Housekeeping“-Gene wurden Cyclophilin (Cyc) und RPLP0 verwendet. Die Faktoren der relativen Verschiebung nach Kreuznormalisierung sind in den jeweiligen Balken angegeben. Die durch den T-Test ermittelten Signifikanzen wurden durch folgende Symbole dargestellt: * = p-Wert < 0,05; ** = p-Wert < 0,005; *** = p-Wert < 0,0005.

Aus diesen Analysen konnte durch den siRNA-vermittelten spezifischen „knock down“ von PTB weder in HeLa- noch in HEK-Zellen ein repressiver Einfluss von PTB auf das Fas-Rezeptor Exon6 nachgewiesen werden (Abbildung 46 A). Lediglich die lösliche Fas-Rezeptor-Variante ist durch den PTB-„knock down“ in HEK-Zellen signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt. Ein völlig anderes, aber in sich einheitliches Bild zeigt sich für Raver1 (Abbildung 46 B und C). Hier zeigen beide Zelllinien zum Teil hoch signifikante ($p < 0,0005$) Verschiebungen beider Spleißvarianten. Die Membran-gebundene Form des Rezeptors ist in Raver1 „knock down“ Zellen klar unterrepräsentiert, das Spleißverhältnis ist deutlich in Richtung löslicher Isoform verschoben.

Anhand der in dieser Arbeit erzielten *in vivo* und *in vitro* Spleißdaten des Fas-Rezeptors konnte der bereits in Datenbanken-Analysen dargestellte Organismen-spezifische alternative Spleißprozess experimentell nachgewiesen werden. Das Fehlen von Raver1 in der Maus scheint somit keinen Einfluss auf die Repression von Exon6 des Fas-Rezeptors zu haben. Außerdem konnte durch die *in vivo* Spleiß-Analysen des Fas-Rezeptors in den humanen Zelllinien HeLa und HEK endogenes PTB als potentieller Repressor des Exon6 nicht bestätigt werden. Durch die siRNA-vermittelte Reduktion der Raver1-Expression wurde im Gegenteil eine deutliche Verschiebung der Isoformen nachgewiesen werden, die sich jedoch genau gegensätzlich zur Raver1-Co-Repressor-Theorie verhält.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte vorrangig geklärt werden, ob Raver1 tatsächlich in PTB-vermittelte Spleißprozesse involviert ist, wie auf Grund von Zellkulturanalysen mit Hilfe von Minigenen postuliert wurde (Gromak et al., 2003a; Rideau et al., 2006). Diese Untersuchungen ziehen darüber hinaus auch eine direkte RNA-Bindung von Raver1 in Betracht, über die eine Funktion als PTB-Co-Repressor vermittelt wird. Ausgehend von dieser "Co-Repressor-Hypothese" wurde daher zunächst die Bindung von Raver1 an RNA (3.1) sowie seine Interaktion mit PTB (3.2) näher charakterisiert, bevor im Tiermodell das Spleißmuster verschiedener PTB-Zielgene in Abhängigkeit der Raver1-Expression untersucht wurde (3.3).

4.1 Die RNA-Bindung durch Raver1 *in vitro*

Lediglich auf Grund von drei durch die Primärsequenz ausgewiesenen N-terminalen RRM's war Raver1 als hnRNP eingruppiert worden. RRM's stellen die am häufigsten auftretenden Bindungsmotive für Protein-RNA Interaktionen in höheren Vertebraten dar und kommen in 0,5-1% der humanen Gene vor (Venter et al., 2001). Bisherige Untersuchungen konnten jedoch keine direkte Assoziation von Raver1 mit RNA zeigen (Dissertation B. Henneberg, 2006). Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass aus Insektenzellen isoliertes, rekombinantes Raver1-Protein nicht in der Lage ist, an RNA zu binden. Weder im UV-, „Crosslink“- noch im RiHoPB-Test konnte eine Interaktion von Raver1 mit RNA-Molekülen nachgewiesen werden. Auch die vergleichenden Analysen an Raver2, das im Gegensatz zu Raver1 als Gesamtprotein rekombinant in *E.coli* exprimiert werden kann (Diplomarbeit S. Swiniarski) zeigten keine Wechselwirkung des Proteins mit RNA. Dass im UV-, „Crosslink“- schwache Signal für Raver1 (Abbildung 13) wurde im Vergleich zu den als Positivkontrollen fungierenden RNA-bindenden Proteinen hnRNP C2 und PTB als falschpositiv eingeschätzt. Zum einen war die Raver1-Bande vergleichsweise schwach und zum anderen zu fokussiert als dass sie eine spezifische Protein-RNA Wechselwirkung darstellen könnte. Eine mögliche Erklärung für die unspezifische Assoziation *in vitro* ist in dem vergleichsweise hohen pI (8,73) von Raver1 zu sehen. Insbesondere der C-terminale Bereich von Raver1 ist mit einem pI von 10,26 extrem basisch und begünstigt somit eine auf unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen beruhende falschpositive RNA-Bindung

in vitro. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits früher beschrieben (Dissertation B. Henneberg, 2006).

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit anhand von Deletionskonstrukten, die lediglich die RRM-Beinheiten beinhalten, für beide Raver-Proteine erstmals nachgewiesen, dass ihre RRM-Domänen prinzipiell in der Lage sind, an RNA zu binden (Abbildung 13). Die Interaktion ist im Vergleich zu hnRNP C2 und PTB deutlich schwächer, aber dennoch spezifisch. Chimäre Proteine, in denen zum einen die RRM-Beinheiten beider Raver-Proteine mit dem C-Terminus von hnRNP C2 fusioniert wurden, zum anderen die singuläre RRM von hnRNP C2 als Fusionsprotein mit den C-Termini von Raver1 und Raver2 exprimiert wurde, dienten zur Analyse eines möglichen inhibitorischen Einflusses der C-terminalen Regionen der Raver-Proteine auf die RRM-Beinheiten. Beide Chimären, die die RRM-Domänen von Raver1 und Raver2 enthielten blieben in ihrer RNA-Bindung auch nach Fusion des hnRNP C2 C-Terminus unbeeinträchtigt. Auch hatte der C-Terminus von Raver2 keinen negativen Einfluss auf die RNA-Assoziation der hnRNP C2 RRM-Domäne. Selbst wenn für Raver1 entsprechende Analysen nicht durchgeführt werden konnten, da sich die entsprechende Chimäre nicht im bakteriellen System exprimieren ließ, kann derzeit nicht von einer generell inhibitorischen Wirkung der basischen C-Termini von Raver1 und Raver2 ausgegangen werden. Auch diese Untersuchungen liefern somit keine Erklärung, weshalb die Raver-Gesamtproteine nicht an RNA binden, obwohl sie jeweils drei bindungskompetente RRM-Domänen aufweisen. Dieses Phänomen könnte nach wie vor mehrere Gründe haben:

Ein limitierender Faktor bei den durchgeführten Analysen ist sicher die Verwendung von rekombinanten Proteinen. Dass die Proteine prinzipiell korrekt gefaltet und somit funktionell sind, kann aus den spezifischen Interaktionen beider Proteine mit PTB geschlossen werden. Allerdings könnten für die RNA-Interaktion posttranslationale Modifikationen erforderlich sein, die bei der heterologen Expression in Insektenzellen (Raver1) oder *E. coli* (Raver2 und alle weiteren Konstrukte) nicht gesetzt werden.

Des Weiteren ist die Bindung der RRM-Domänen beider Raver-Proteine an RNA im Vergleich zu PTB und hnRNP C2 deutlich schwächer, auch in den chimären Proteinen. Es wäre daher durchaus denkbar, dass die RRM-Beinheiten der Raver-Proteine *in vivo* ausschließlich der Protein-Protein-Interaktion mit anderen Proteinen dienen und die *in vitro* Assoziation mit RNA lediglich ein Indiz dafür ist, dass diese Domänen noch die klassische $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Struktur aufweisen. Eine RRM-vermittelte Wechselwirkung zweier Proteine wurde bereits beschrieben. Sie kann über zwei miteinander interagierende RRM-Beinheiten vermittelt werden, oder die RRM eines Proteins kann mit anderen Bereichen eines weiteren Proteins interagieren

(Maris et al., 2005; Stefl & Allain, 2005). Allerdings muss durch eine solche Interaktion nicht zwangsläufig die RNA-Bindung der RRM's beeinträchtigt oder unterbunden werden. Vielmehr sind verschiedene RNA-bindende Proteine, darunter der Spleißfaktor Transformer2-Beta1 und auch PTB beschrieben, bei denen sowohl Protein- als auch RNA-Interaktionen über ein und dieselbe RRM-Domäne erfolgen (Rideau et al., 2006; Novoyatleva et al., 2008). Andere Proteine wiederum können erst mit RNA interagieren, wenn sie in entsprechende Proteinkomplexe rekrutiert worden sind. Ein solches Beispiel liefern die Proteine Y14 (ein RRM-beinhaltenes Protein) und Magoh. Beide Proteine sind Komponenten des „exon-exon junction complex“ (EJC) in Vertebraten, die stabile Komplexe miteinander bilden (Lau et al., 2003). In *in vivo* Analysen konnte gezeigt werden, dass Y14 sowie auch Magoh mit gespleißter RNA in einem Komplex vorliegen (Kim et al., 2001). Der isolierte Y14-Magoh-Komplex weist dabei jedoch keine RNA-Bindung auf. Letztere wird erst durch die Interaktion mit weiteren Mitgliedern des EJC ermöglicht (Fribourg et al., 2003; Kim et al., 2001). Der molekulare Schalter, der eine RRM dazu veranlasst, nicht RNA sondern Protein zu binden, ist noch nicht bekannt (Chen und Varani, 2005). Die genannten Beispiele verdeutlichen jedoch, dass RRM's nicht ausschließlich eine Bindung an RNA vermitteln und somit nicht jedes potenzielle RNA-bindende Protein auch tatsächlich direkt mit RNA assoziiert sein muss (Clery et al., 2008).

Ein drittes denkbare Szenario wäre, dass Raver-Proteine nur in einem bestimmten zellulären Kontext in der Lage sind, an RNA zu binden. Dies könnte dann beispielsweise post-translationale Modifikationen der Raver-Proteine oder spezifische Interaktionen mit weiteren zellulären Proteinen erfordern. Auch eine Kombination beider Faktoren wäre möglich, wie es in Jurkat-Zellen (immortalisierte T-Lymphozyten) für das „Skipping“ von Exon4 der RNA des Oberflächenrezeptors CD45 gezeigt wurde (Melton et al., 2007). Die Aktivierung von Proteinkinase C durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), einem Phorboldiester, führte zu einer signalabhängigen post-translationalen Modifikation von hnRNP L, welches daraufhin an einen „exonic splicing silencer“ (ESS) rekrutiert wurde. Die repressive Wirkung des aktivierten hnRNP L wurde durch die gleichzeitige Assoziation von einem weiteren hnRNP, dem „PTB associated splicing factor“ (PSF) an dieselbe ESS verstärkt. Im Gegensatz dazu konnte eine Beteiligung von PSF am alternativen Spleißen von Exon4 des CD45-Gens in unstimulierten Zellen nicht nachgewiesen werden (Melton et al., 2007). In Analogie zu dem genannten Beispiel könnten auch Raver-Proteine erst post-translational modifiziert werden müssen, um ihre RNA-Bindung zu „aktivieren“ und somit die repressive Wirkung von PTB zu verstärken. Es gibt zwar erste Hinweise auf mögliche Phosphorylierungsstellen

(Dissertation A. Zieseniss, 2005) eine Bestätigung derselben steht jedoch noch aus. Auch konnte bisher noch keine RNA-Bindung von Raver1 in proliferierenden murinen (C2C12) und humanen (HeLa) Zelllinien gezeigt werden (Dissertation B. Henneberg, 2006). Die Relokation von Raver1 an kontraktile Strukturen während der Differenzierung von C2C12-Myoblasten sowie in differenzierten Muskelzellen (Hüttelmaier et al., 2001) liefert jedoch einen ersten Hinweis darauf, dass eine wie auch immer geartete Modifikation des Raver1-Proteins erfolgt, die die subzelluläre Lokalisation und somit möglicherweise auch die RNA-Bindung beeinflusst. Selbst in der Literatur ist bisher keine zelluläre Situation beschrieben, in der Raver1 direkt an RNA gebunden vorliegt. Vor kurzem konnte anhand von FRET-Analysen gezeigt werden, dass Raver1 mit Fluoreszenz-markierter RNA in PNCs wechselwirken kann. In den untersuchten Zellen war durch RNA-Interferenz der endogene PTB-Gehalt reduziert worden, so dass der Autor daraus schloss, dass Raver1 direkt an die RNA gebunden sein muss (Lorenz, 2009). Während das Auftreten von FRET-Signalen sicherlich ein Indiz für eine direkte Interaktion von Raver1 mit RNA ist, könnte diese jedoch nach wie vor über eine Assoziation mit anderen Proteinen, insbesondere in so kompakten Strukturen wie den PNCs erfolgen. Andererseits wurde durch den „knock down“ nicht der gesamte PTB-Proteingehalt der Zelle eliminiert, auch wenn der Autor lediglich PNCs untersucht hat, in denen in der Immunfluoreszenz kein PTB in diesen Strukturen nachgewiesen werden konnte (Lorenz, 2009). In so genannten CLIP-Versuchen, in denen eine kovalente Vernetzung von Proteinen und RNA durch UV-Licht induziert wird (Ule et al., 2003) und sich so beispielsweise die *in vivo* Assoziation von PTB und hnRNP C2 mit RNA eindeutig nachweisen lässt (Koloteva-Levine et al., 2002; Wollerton et al., 2001), konnte eine Bindung von Raver1 an RNA jedenfalls noch nicht nachgewiesen werden (Dissertation B. Henneberg, 2006).

4.2 Die Interaktion von Raver-Proteinen mit PTB

Da beide Raver-Proteine keine direkte RNA-Bindung zeigen, ist derzeit davon auszugehen, dass eine Bindung an RNA *in vivo* überwiegend indirekt über die Assoziation mit PTB erfolgt. *In vitro* konnten in RiHoPB-Analysen sowohl für Raver1 als auch für Raver2 trimere Komplexe mit PTB und immobilisierten Ribohomopolymeren nachgewiesen werden (diese Arbeit und Dissertation B. Henneberg, 2006). Die Interaktion der Raver-Proteine mit PTB erfolgt dabei im Wesentlichen über definierte Bindungsmotive, deren Sequenz jeweils dem Konsensus-Motiv [S/G][L/I]LGxxP entspricht (Rideau et al., 2006; Diplomarbeit S. Becke,

2008). Dieses Sequenzmotiv wurde ursprünglich über die Analyse von Raver1-Deletionskonstrukten und synthetischen Peptiden identifiziert (Rideau et al., 2006). Raver1 weist insgesamt vier solche Motive auf (Abbildung 21) und in der Primärstruktur von Raver2 sind zwei entsprechende Bindungsmotive enthalten (Abbildung 25). Für eine starke Bindung an PTB scheinen vor allem die Leucinreste von besonderer Bedeutung zu sein, da deren Austausch gegen Alaninreste bei allen verwendeten Raver1-Peptiden eine signifikante Reduktion der Assoziation mit PTB bewirkte. Die gleichzeitige Mutation aller vier Motive im Gesamt-Raver1-Protein zeigte ebenfalls eine stark reduzierte Interaktion mit PTB *in vitro* (Rideau et al., 2006). Auch für Raver2 sind diese Bindungsmotive von besonderer Bedeutung für dessen Wechselwirkung mit PTB. „Yeast-Two-Hybrid“-Analysen und immunocytochemische Untersuchungen ergaben, dass eine Mutation der Leucinreste innerhalb der beiden Bindungsmotive die Bindung des Raver2-Gesamtproteins an PTB deutlich abschwächt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Assoziation vor allem durch eines der beiden Motive, das SLLG-Motiv, vermittelt wird. Dies zeigte sich vor allem darin, dass eine Raver2-Mutante, in der die Leucine gegen Alanine ausgetauscht worden waren (SAAG-Mutante) nicht mehr effizient in PNCs rekrutiert werden konnte (Diplomarbeit S. Becke, 2008). Um zu überprüfen, ob auch im Raver1-Protein das einzige SLLG-Motiv (Bindungsmotiv M3) eine essenzielle Bedeutung für die Rekrutierung des Proteins in PNCs hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Raver1-Bindungsmutanten M1-M4 verwendet, in denen über Mutationen die Leucine der Bindungsmotive gegen Alanine substituiert worden waren. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte auch für Raver1 das Bindungsmotiv M3 als essentiell für die Rekrutierung von Raver1 in die PNCs identifiziert werden. Da PTB als zentrale Komponente dieser Strukturen auch für deren Erhalt verantwortlich ist (Wang et al., 2003) kann die Rekrutierung von Raver-Proteinen in PNCs somit auch als Indiz für eine effektive Bindung an PTB gewertet werden.

Da keine rekombinanten Raver1-Mutanten zur Verfügung standen, wurde für biochemische Analysen wieder auf bakteriell exprimiertes Raver2-Proteine zurückgegriffen. Über „Pulldown“-Experimente und „Dot-Overlay“-Analysen konnte auch *in vitro* das SLLG-Motiv als Hauptmotiv der direkten Interaktion mit PTB im Raver2-Protein identifiziert werden. Somit wurden nicht nur die mikroskopischen Analysen (Diplomarbeit S. Becke 2008) bestätigt, sondern es wurde auch gezeigt, dass es tatsächlich eine direkte Korrelation zwischen PNC-Rekrutierung und Interaktion mit PTB gibt. Da die Aminosäure-Sequenzen der SLLG-Motive beider Raver-Proteine identisch sind, können die für Raver2 generierten Daten durchaus auf Raver1 übertragen werden. Darüber hinaus muss man auf Grund dieser Daten

auch kritisch hinterfragen, ob es sich bei den in den bereits erwähnten FRET-Analysen (Lorenz, 2009) untersuchten Raver1-Aggregaten tatsächlich um PNCs gehandelt haben kann, da diese zum einen durch PTB charakterisiert werden und die Rekrutierung von Raver1 und Raver2 in diese Strukturen spezifisch durch PTB über das SLLG-Motiv erfolgt. Alternativ müsste tatsächlich davon ausgegangen werden, dass die Expression von PTB in den untersuchten Zellen nicht vollständig unterdrückt wurde, auch wenn immunocytochemisch kein PTB-Protein nachgewiesen wurde.

Das SLLG-Motiv scheint dabei im Übrigen ein generelles Bindungsmotiv für PTB darzustellen, da auch hnRNP L, ein weiterer Interaktionspartner von PTB (Hahn et al., 1998) ebenfalls ein solches Bindungsmotiv aufweist (Rideau et al., 2006). Die Wechselwirkungen von Raver-Proteinen mit anderen Bindungspartnern müssen jedoch nicht zwangsweise über dasselbe Motiv erfolgen. So konnte bereits für Raver2 gezeigt werden, dass die Selbstassoziation des Proteins durch die RRM2 vermittelt wird (Diplomarbeit S. Swiniarski, 2005). Darüber hinaus wurde mit dem hnRNP CELF4 ein Raver2-Ligand identifiziert (Diplomarbeit N. Kieper, 2007) dessen Assoziation mit Raver2 nicht durch Mutationen in den beiden PTB-Bindungsmotiven von Raver2 beeinflusst wird (Diplomarbeit S. Becke 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte somit die Ausbildung trimerer Raver-PTB-RNA-Komplexe *in vitro* nicht nur bestätigt werden, sondern auch ein einziges SLLG-Peptidmotiv identifiziert werden (M3 in Raver1; SLLG in Raver2) das die Bindung der Raver-Proteine an PTB und somit auch deren indirekte Bindung an RNA wesentlich beeinflusst. Es konnte weiterhin erstmals eine direkte kausale Verknüpfung zwischen der Bindung an PTB und einer Rekrutierung in PNCs hergestellt werden. Diese Daten werden auch durch frühere Befunde unterstützt, in denen gerade in PNCs eine starke Interaktion von Raver1 mittels FRET-Analysen gezeigt werden konnte (Rideau et al., 2006). Letztere Daten hatten auch eine Wechselwirkung beider Proteine im Nucleoplasma ausgewiesen. Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, als die PNCs transformierter Zellen zwar ein exzellenter Marker für Raver-PTB Interaktionen sind, wahrscheinlich aber für die im Folgenden untersuchten Spleißprozesse wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle spielen.

4.3 Raver1 als Modulator alternativer Spleißprozesse

Durch die vergleichenden qPCR-Analysen der Raver1-KO-Mäuse mit Wildtyp-Tieren wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vivo* untersucht, ob der Verlust des Raver1-Proteins auch in einem physiologischen Kontext PTB-vermittelte Spleißprozesse beeinflusst. Die Analysen konzentrierten sich dabei vor allem auf das alternative Spleißen von drei bekannten PTB-Zielgenen: α -Tropomyosin, FGF-R2 und c-src. Es konnten tatsächlich gewebespezifische Verschiebungen in den relativen Verhältnissen der alternativen Isoformen in Abhängigkeit der Raver1-Expression beobachtet werden, so dass dies ein erstes Indiz für die Beteiligung von Raver1 an der alternativen Prozessierung von RNA *in vivo* war. Allerdings konnten nicht alle Veränderungen mit der postulierten Co-Repressor-Theorie (Rideau et al., 2006) in Einklang gebracht werden, nach der Raver1 die repressive Wirkung von PTB verstärken sollte (Tabelle 5). Die *in vivo* Daten widersprechen somit zumindest teilweise früheren Beobachtungen, in denen allerdings die Modulation der PTB-Spleißaktivität ausschließlich in Minigen-Analysen untersucht wurde (Chan & Black et al., 1997; Gooding et al., 1998; Carstens et al., 2000).

Da durch die Analyse der Raver1-KO-Mäuse zwar ein Einfluss von Raver1 auf den Spleißprozess selbst gezeigt werden konnte, nicht aber, ob dieser auch über PTB vermittelt erfolgte, wurden zusätzliche Analysen an Zellkulturen durchgeführt, in denen durch RNA-Interferenz entweder die Expression von PTB oder Raver1 reduziert wurde. Bei vergleichender Analyse der Spleißmuster sollten im Falle einer co-repressiven Wirkung von Raver1 gleiche Tendenzen nach „knock-down“ von PTB und Raver1 beobachtet werden. Die Wahl der humanen Zelllinien HeLa und HEK begründete sich vor allem dadurch, dass in beiden Zelllinien die Expression von PTB und Raver1 effizient durch Transfektion entsprechender siRNAs unterdrücken ließ. In früheren Experimenten konnten keine siRNA-Sequenzen identifiziert werden, durch die in entsprechendem Maße der Raver1-Spiegel in der Maus reduziert werden konnte (persönliche Mitteilung PD Dr. S. Illenberger). Des Weiteren besitzen C2C12-Zellen einen stark reduzierten PTB-Proteingehalt, da in diesen Zellen vorrangig die neuronale Variante nPTB exprimiert wird (Boutz et al., 2007).

Abschließend wurde auch das alternative Spleißen des Fas-Rezeptors als weiteres PTB-Zielgen untersucht (Izquierdo et al., 2005). Hierbei standen vor allem zwei Aspekte im Vordergrund: Zum einen wurde dieses Spleißen bisher nur in humanen, nicht aber Mauszellen untersucht, so dass die vergleichende Analyse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellsysteme in Bezug auf das endogene Spleißen zeigen sollte, ob auch eine entsprechende

Prozessierung des Fas-Rezeptors in der Maus auftritt. Darüber hinaus war freundlicherweise von Prof. J. Valcarcel (Barcelona, Spanien) das entsprechende (humane) Minigen zur Verfügung gestellt worden, anhand dessen die Repression des Exon6 durch PTB *in vitro* zuvor analysiert worden war (Izquierdo et al., 2005). Es war daher zumindest für dieses Gen die Möglichkeit gegeben, *in vitro* Spleißsysteme mit endogenen Prozessen zu vergleichen. Im Folgenden wird zunächst die Vergleichbarkeit von *in vitro* und *in vivo* Analysen am Beispiel des Fas-Rezeptors betrachtet (4.3.1) bevor die beobachteten Spleißverschiebungen für die drei vorrangig untersuchten Zielgene (4.3.2) und eine mögliche Beteiligung von Raver1 (4.3.3) diskutiert werden.

4.3.1 Minigene und *in vivo* Analysen im Vergleich

In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen *in vivo* und *in vitro* Analysen deutlich stringenter unterschieden als es in der Literatur üblich ist. So werden Spleiß-Analysen, die mit Hilfe von Minigenen durchgeführt wurden als *in vitro* Studien gewertet, da in diesen, abgesehen vom physiologischen zellulären Hintergrund, artifizielle Konstrukte verwendet werden, die im eigentlichen Organismus so nicht existieren. In Anbetracht der Tatsache, dass einige der für die Raver1-KO-Mäuse erzielten Daten widersprüchlich zu vorherigen *in vitro* Analysen waren, war es notwendig, zumindest exemplarisch endogene Spleißprozesse mit Minigen-Analysen direkt vergleichen zu können, da die Diskrepanzen durchaus auf systemimmanenten Unterschieden beruhen könnten.

In HeLa-Zellen wurde bereits ein Repressor-Effekt für PTB und auch eine co-repressive Wirkung von Raver1 für das Fas-Rezeptor Exon6 mittels Minigen-Analysen nachgewiesen (Izquierdo et al., 2005). Die Co-Repressor-Funktion von Raver1 wurde hierbei allerdings durch zusätzliche Modifizierung des verwendeten Minigens erzielt. Dabei bediente man sich des MS2-Systems des Bakteriophagen MS2 (Keryer-Bibens et al., 2008). Dies ist eine häufig angewendete Methode für Minigen-Analysen. In diesem System wurde Raver1 mit einem Fusionsanteil exprimiert, welcher für das MS2-„coat-protein“ kodiert. Damit wurde Raver1 hochaffin an die inserierten Bindungsstellen des MS2-Proteins im Minigen gezwungen. Somit sind diese Analysen nicht mehr abhängig von der Raver1-Interaktion mit PTB, was einen weiteren artifiziellen Faktor dieses System darstellt, da Raver1 in undifferenzierten Zellen keine direkte RNA-Interaktion zeigt, sondern diese eher über PTB vermittelt wird (Dissertation B. Henneberg, 2006).

Als erstes muss festgestellt werden, dass das Exon6 in Mäusen nicht alternativ gespleißt wird und das alternative Spleißen des Fas-Rezeptors somit Organismen-spezifisch zu sein scheint, wie durch *in vivo* Spleiß-Analysen auf murinen Geweben gezeigt werden konnte (Abbildung 45). Sequenzanalysen haben aber schließlich ergeben, dass im Mausgen keine dem Menschen entsprechenden Spleißstellen für das Exon6 vorhanden sind, so dass davon ausgegangen werden muss, dass in der Maus eine entsprechende Prozessierung nicht stattfinden kann. Dabei sind Mauszellen durchaus in der Lage, das für die *in vitro* Studien verwendete Minigen des humanen Fas-Rezeptors alternativ zu prozessieren. Im Gegensatz zu den humanen Zelllinien ist hierfür noch nicht einmal eine Modifikation der Tia-1-Bindungsstellen erforderlich, um ein „Skipping“ des Exon6 zu induzieren (Abbildung 44). Allerdings hatte die Inaktivierung des Raver1-Gens in murinen MEFR1-KO-Zellen auch keinen Einfluss auf die Inkorporation des alternativ gespleißten Exon6 im humanen Minigen. Dies ist insofern nicht völlig unerwartet, da Computer-gestützte Analysen belegen, dass gerade einmal 10-20% der alternativen Spleißprozesse zwischen Mensch und Maus konserviert sind (Pan et al., 2005). Zudem wurden in isolierten humanen HeLa-Spleißosomen bereits über 100 Proteine identifiziert, die mit diesem Komplex wechselwirken, wodurch die Komplexität eines solchen alternativen Spleißprozesses noch mehr verdeutlicht wird (Sharma et al., 2008). Um zumindest einen direkten Vergleich zwischen der Prozessierung des Minigens und endogenen Spleißvorgängen darstellen zu können, wurden abschließend RNAi-Experimente mit siRNAs gegen PTB und Raver1 in HeLa- und HEK-Zellen durchgeführt und mit den *in vitro* Daten der Literatur verglichen. Die Analysen des endogenen Spleißens des Fas-Rezeptors in beiden Zelllinien ergaben, dass der direkte „knock down“ von PTB keinen eindeutig erkennbaren Effekt zeigte. Vor allem in HEK-Zellen wies lediglich die Reduktion der löslichen Form des Fas-Rezeptors, die durch Exon-„Skipping“ von Exon6 generiert wird, indirekt auf eine mögliche Repressorfunktion von PTB hin (Abbildung 46). Im Gegensatz dazu konnte für Raver1 sowohl in HEK als auch in HeLa Zellen eine Beteiligung des Proteins am alternativen Spleißen des Fas-Rezeptors nachgewiesen werden. Allerdings verhält sich die Verschiebung der Spleißvarianten entgegen der angenommenen Co-Repressor-Theorie. Durch den Verlust von Raver1 in den „knock down“-Zellen sollte es eigentlich zu einem Anstieg an inkorporiertem Exon6 kommen und so mehr Membran-gebundener Fas-Rezeptor gebildet werden. Die diesen Erwartungen entgegen gesetzten Ergebnisse könnten auf eine Interaktion von Raver1 mit einem anderen Protein hindeuten, welches ebenfalls in den alternativen Spleißprozess des Fas-Rezeptors involviert ist. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre das Tia-1 Protein, welches als direkter Antagonist von PTB die Inkorporation des Fas-Rezeptor Exon6

begünstigt (Izquierdo et al., 2005; Izquierdo & Valcarcel, 2007). Sollte Raver1 tatsächlich mit Tia-1 und PTB interagieren, könnte es modulierend auf die Aktivität beider Spleißregulatoren einwirken und somit als molekularer Schalter fungieren. Im Falle der geringeren Raver1-Expression nach RNAi-Behandlung könnten dann die Auswirkungen bezüglich der Spleißaktivität für Tia-1 gravierender sein als für PTB. Da für alternative Spleißprozesse angenommen wird, dass antagonistisch wirkende Spleißfaktoren miteinander konkurrieren (Martinez-Contreras et al., 2007), könnte durch eine Abschwächung von Tia-1 eine effektivere Repression des Exon6 durch PTB ermöglicht werden als in Anwesenheit von Raver1, da der Antagonist Tia-1 in seiner Funktion benachteiligt wäre.

Die vergleichenden Spleiß-Analysen von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen am Fas-Rezeptor belegen, dass bei der Komplexität möglicher an den Spleißprozessen beteiligter Faktoren eine direkte Übertragung von Minigen-Analysen auf die physiologischen Spleißaktivitäten nicht möglich ist. So konnte die Funktion von PTB als Repressor des Fas-Rezeptor Exon6 in den vorliegenden *in vivo* Studien nicht eindeutig bestätigt werden. Auch eine co-repressive Wirkung von Raver1 muss auf Grund der vorliegenden Daten eher negiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen auch noch einmal die Problematik der MS2-Rekrutierung potenzieller Spleißfaktoren an Minigenen, die eine drastische Verschiebung der Assoziation des zu untersuchenden Proteins an eine im Überschuss angebotene RNA-Sequenz darstellt und daher Aktivitäten aufzeigt, die den physiologischen Bedingungen keinesfalls entsprechen müssen. Hinzu kommt, dass auch Organismenspezifische sowie Gewebe-spezifische Unterschiede existieren, die mit diesem System ebenfalls nicht dargestellt werden können. In der folgenden Diskussion der drei hauptsächlich analysierten Zielgene wird daher auf detaillierte Erklärungen verzichtet, weshalb die *in vivo*-Analysen gegebenenfalls von den bereits publizierten *in vitro*-Daten abweichen.

4.3.2 Der Einfluss von Raver1 auf drei PTB-Zielgene *in vivo*

Mit den in der Arbeitsgruppe von Prof. H.H. Arnold generierten Raver1-KO-Mäusen (Lahmann et al., 2008) stand erstmals ein *in vivo* System zur Verfügung, anhand dessen der Einfluss von Raver1 auf die endogene Prozessierung von RNAs analysiert werden konnte, für die eine Regulation durch PTB diskutiert wird. Aus ursprünglich sechs Genen wurden schließlich drei ausgewählt, deren Spleißmuster im Mausmodell und in ergänzenden Zellkulturexperimenten analysiert wurden. Die Auswahl der PTB-Zielgene c-src,

α -Tropomyosin und FGF-R2 erfolgte zum einen auf Grund von Spleißverschiebungen, die bereits in den initialen qPCR-Analysen nachgewiesen wurden (c-src und FGF-R2). Die Prozessierung der RNA von c-src war insbesondere im Kontext des milden neuronalen Phänotyps der Raver1-KO-Mäuse von Interesse (siehe auch 4.3.2.1), die Analysen des FGF-R2 hatten die deutlichsten Verschiebungen gezeigt, die darüber hinaus zwischen den untersuchten Geweben nicht einheitlich waren. Zum anderen wurde die zu Beginn der Arbeit vorliegende Datenlage berücksichtigt, bei der die alternative Inkorporation der Exons 2 und 3 des α -Tropomyosin-Gens das am genauesten untersuchte System darstellte und somit als Referenzgen fungieren sollte (Gooding et al., 1994; 1998; Gromak et al., 2003a; Rideau et al., 2006). Generell ist anzumerken, dass sich Spleißverschiebungen im Idealfall durch eine inverse Korrelation der beiden Isoformen darstellen lassen. Das bedeutet, dass die Abnahme einer Isoform zu einer erhöhten Inkorporation des alternativen Exons in die mRNA führt. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit auch Spleißverschiebungen beobachtet, in denen sich in bestimmten Geweben ausschließlich eine Isoform verschiebt. Somit stellt sich die Frage, ob die Expression einer Isoform immer direkt von der Reduktion der alternativen Isoform abhängig ist. Vor allem in Anbetracht der Komplexität solcher Spleißmechanismen muss diese Frage jedoch eher negiert werden. So konnten in isolierten Spleißosomen aus HeLa- und WERI-1-Zellen eine hohe Anzahl von Spleiß-assoziierten Proteinen identifiziert werden, die ausschließlich in einer der beiden Zelllinien an der Prozessierungs-Maschinerie beteiligt sind, während sie in der anderen Zelllinie keine Rolle zu spielen scheinen (Sharma et al., 2008). Es ist sogar denkbar, dass die spezifische Regulation eines Exons ausreicht, um Spleißverschiebungen zu induzieren, wie es beispielsweise für das α -Tropomyosin-Gen untersucht wurde, bei dem eine spezifische Repression lediglich für Exon3 gezeigt wurde (Gromak & Smith, 2002).

Schließlich bleibt anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit die relativen Verschiebungen im Spleißmuster betrachtet wurden, aber keine Berechnung der absoluten Werte erfolgte. So kann in diesen Analysen eine Verschiebung um wenige Prozent sich deutlicher für die Isoform manifestieren, deren Expression generell niedriger ist. Mit Tabelle 6 wurde versucht, diesem Phänomen Rechnung zu tragen. Ein Beispiel wäre das alternative Spleißen von c-src im Darm. Da in diesem Gewebe die neuronale Isoform deutlich schwächer exprimiert wird als die nicht-neuronale Variante, wäre eine Verschiebung der neuronalen Isoform eher nachweisbar, als eine Veränderung der stark exprimierten nicht-neuronalen Isoform. Allerdings lassen sich nicht alle Modulationen durch eine unterschiedliche Ausgangsexpression erklären. Hier muss in der Tat berücksichtigt werden, dass die

Generierung alternativer Isoformen meist von unterschiedlichen Spleißfaktoren reguliert wird, die nicht in gleichem Maße auf beide Spleißvarianten einwirken (Smith & Valcarcel, 2000; Sharma et al., 2008).

Da es in allen Genen zu unterschiedlichen Spleißverschiebungen der alternativen Isoformen in Abhängigkeit der untersuchten Gewebe kam, werden diese drei Gene im Folgenden separat voneinander betrachtet.

4.3.2.1 c-src

Als Mitglied der proto-onkogenen Tyrosinkinasen wurde c-src (abgeleitet von „cellular-sarcoma“) auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit als zelleigenes Homolog des v-src („viral-sarcoma“) identifiziert (Stehelin et al., 1977). Über alternatives Spleißen werden zwei Isoformen von c-src gebildet (Pyper et al., 1989). In neuronalen Zellen wird das kurze 18nt-Exon (N1) bevorzugt in die mRNA inseriert und lokalisiert zwischen den konstitutiv gespleißten Exons 3 und 4 (Chan & Black 1997). Mit der Spleiß-Analyse des c-src wurde somit ein neuronales Zielgen ausgewählt, dessen neuronal exprimierte Isoform durch PTB in nicht-neuronalen Zellen reprimiert wird (Chan & Black 1997). Die Wahl dieses Gens zur Untersuchung einer möglichen Raver1 Beteiligung an diesem PTB-vermittelten Spleißprozess begründete sich unter anderem auf der veränderten synaptischen Plastizität der Hippocampi von Raver1-KO-Mäuse im Bereich der Langzeitpotenzierung (LTP) (Lahmann et al., 2008). Dieses in Synapsen von Nervenzellen beobachtete Phänomen ist ein ausschließlich neuronaler Vorgang (Pelletier & Lacaille, 2008), so dass die Analyse neuronaler Spleißvorgänge sinnvoll erschien.

Die initialen qPCR-Analysen für Raver1 zeigten zudem eine Beteiligung am alternativen Spleißen des c-src-Gens im Darm (Abbildung 34). Dabei kam es durch den Verlust von Raver1 in den Raver1-KO-Mäusen zu einem Anstieg der neuronalen Isoform, die durch die Inkorporation des ExonN1 charakterisiert ist. Somit würde Raver1 eine co-repressive Wirkung auf die Unterdrückung des N1-Exons durch PTB haben, welche in den Raver1-KO-Mäusen nicht stattfindet und so im Darm zu einer erhöhten Expression der neuronalen c-src-Isoform führt. Im Hirn hingegen zeigt der Verlust des Raver1-Proteins keinen Einfluss auf das Spleißmuster von c-src. Dies ist allerdings insofern nicht unbedingt verwunderlich, da bereits gezeigt werden konnte, dass PTB in neuronalen Zellen in einem ATP-abhängigen Prozess von der RNA abgelöst wird und dissoziiert (Chou et al., 2000). Falls die co-repressive Wirkung von Raver1 auf das N1-Exon des c-src-Gens ausschließlich über PTB erfolgt,

könnte das Raver1-Protein zumindest in neuronalen Strukturen seine Funktion als Co-Repressor des N1-Exons nicht ausüben, da der eigentliche Repressor PTB als Ligand fehlt. Einen *in vivo* Nachweis, dass es sich beim alternativen Spleißen des c-src-Gens um einen PTB-vermittelten Prozess handelt, zeigen jedoch eindeutig die qPCR-Analysen der humanen Zelllinien HeLa und HEK (Abbildung 40), da es hier in Folge einer durch RNAi verursachten Reduktion von PTB zu einer stark erhöhten Inkorporation des neuronalen ExonN1 in die mRNA kommt. Überraschenderweise kam es in allen weiteren untersuchten Mausgeweben sowie auch in den humanen Zelllinien HeLa und HEK durch den Verlust oder zumindest eine Reduktion von Raver1 zu einer tendenziellen, teils sogar signifikanten Abnahme beider c-src-Isoformen. Die gleichzeitige Abnahme der Menge an prozessierter Gesamt-mRNA des untersuchten Zielgens deutet darauf hin, dass die Ursache möglicherweise in einer reduzierten Transkriptionsrate dieses Gens liegt und daher unabhängig von der Spleißaktivität von PTB ist.

Bisher konnte keine Beteiligung von Raver1 auf die Transkription nachgewiesen werden. Die Interaktion des Proteins mit verschiedenen Aktin-Konformationen, wahrscheinlich auch im Kern, bietet allerdings Raum für Spekulationen (Dissertation A. Zieseniss, 2005). Neuere Untersuchungen belegen, dass im Kern lokalisiertes, so genanntes nicht-filamentöses „Kern-Aktin“ als Co-Faktor aller drei RNA-Polymerasen eine unmittelbare Rolle in der Transkription spielt (Hofmann et al., 2004; Philimonenko et al., 2004; Hu et al., 2004). Außerdem wurde Kern-Aktin als Komponente von Chromatin-„remodelling“-Komplexen wie BAF und dem INO80-Komplex beschrieben und könnte als Bestandteil dieser Komplexe ebenfalls Einfluss auf die Transkription nehmen (Shen et al., 2003; Farrants et al., 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Kern-Aktin mit verschiedenen Sub-Typen einiger hnRNP-Mitglieder interagiert (Percipalle et al., 2002). Für Raver1 konnte in Gelfiltrationsexperimenten zumindest gezeigt werden, dass Raver1, PTB und Aktin in denselben (Kern-)Fraktionen eluieren. Inwieweit es tatsächlich zu einer direkten Komplexbildung *in vivo* kommt ist derzeit jedoch nicht bekannt (Dissertation A. Zieseniss, 2005). Es ist allerdings denkbar, dass der Verlust von Raver1 durch dessen Interaktion mit Kernaktin auch Einfluss auf die Transkription bestimmter Gene nehmen könnte.

Schließlich könnte die Ursache des reduzierten c-src-mRNA-Gehalts in den untersuchten Geweben und Zellen auch eine Folge des „NMD-Pathway“ sein. Dieser degradiert meist aberrante mRNAs, die ein verfrühtes terminales Stoppcodon (PTC = „premature termination codon“) auf Grund von Mutationen oder Fehlern während der Transkription und der anschließenden RNA-Prozessierung beinhalten. Es hat sich darüber hinaus auch gezeigt, dass

eine hohe Anzahl von funktionellen alternativ gespleißten Isoformen ohne PTCs über den „NMD-Pathway“ post-transkriptional reguliert werden (Lejeune & Maquat 2005; Rehwinkel et al., 2005). Dadurch konnte belegt werden, dass alternative Spleißprozesse eng mit dem „NMD-Pathway“ verknüpft sind. So ist es denkbar, dass durch den Verlust von Raver1 in den nicht-neuronalen Geweben Lunge, Herz und Uterus (Abbildung 36) die neuronale Variante derart stark bevorzugt wird und in Folge des hohen mRNA Anteils dieser Isoform durch den „NMD-Pathway“ degradiert wird. Diese Annahme lässt sich auch auf die verwendeten humanen, durch Raver1-siRNA behandelten Zelllinien übertragen, in denen ebenfalls die neuronale Isoform zusammen mit dem Gesamt-mRNA-Gehalt von c-src abnimmt.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Beteiligung von Raver1 am PTB-vermittelten Spleißen des c-src-Gens nicht eindeutig geklärt werden konnte. Lediglich im Darm bewirkt die Inaktivierung des Raver1-Gens eine Spleißverschiebung, die mit einer co-repressiven Wirkung von Raver1 auf das N1-Exon korreliert werden kann. In den meisten Geweben sowie in den analysierten Zellsystemen ist eher eine von der Raver1-Expression beeinflusste Veränderung in der Gesamt-Transkriptmenge zu beobachten. Es bleibt zu zeigen, ob letztere eher auf einer verringerten Transkriptionsrate oder einem verstärkten Abbau durch NMD begründet ist. Die in den Raver1-KO-Mäusen auftretenden Veränderungen in der synaptischen Plastizität hippocampaler Neurone lassen sich zu dem gegenwärtigen Zeitpunkt jedenfalls nicht über eine Modulation von c-src-Isoformen erklären.

4.3.2.2 α -Tropomyosin

Das fibrilliäre Strukturprotein α -Tropomyosin (Tpm1), welches an der Kontraktionsregulation von Muskelzellen beteiligt ist (Balvay & Fizman, 1994; Lin et al., 2008) gilt als eines der am besten charakterisierten Systeme für PTB-vermittelte Spleißprozesse. Dabei konnte PTB als Repressor des alternativen Exon3 (NM-Exon) identifiziert werden, welches verstärkt in Glattmuskel-Zellen reprimiert wird (Gooding et al., 1994; 1998; Gromak et al., 2003a). In demselben System wurde auch erstmals eine mögliche Funktion von Raver1 als PTB-Co-Repressor diskutiert. In PAC-1 Glattmuskel-Zellen verstärkt dabei die Anwesenheit von Raver1 die repressive Wirkung von PTB auf das Exon3 des α -Tropomyosins (Gromak et al., 2003a; Rideau et al., 2006). Die bisherigen Untersuchungen begründen sich dabei vorrangig auf Spleiß-Analysen, in denen α -Tropomyosin-Minigene verwendet wurden. Zumindest die repressive Wirkung von PTB auf das NM-Exon konnte bereits in *Xenopus*

Oozyten *in vivo* nachgewiesen werden (Le Sommer et al., 2005). Durch die Analysen des α -Tropomyosin-Gens im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals *in vivo* eine Beteiligung von Raver1 als Co-Repressor von PTB in zwei unabhängigen Systemen dargestellt werden.

In den meisten murinen Geweben (Herz, Lunge, Uterus) führte der Verlust von Raver1 zu einer Verschiebung in den α -Tropomyosin-Isoformen, die der Co-Repressor-Theorie entsprechen (Abbildung 35). Am deutlichsten ist dabei die Verschiebung beider Isoformen in der Lunge, in der es zu einer signifikant erhöhten Inkorporation des NM-Exon bei gleichzeitiger, ebenfalls signifikanter Abnahme des SM-Exons kommt. Lediglich in den für die initialen Analysen verwendeten Gewebe Hirn und Darm scheint Raver1 keinen Einfluss auf das alternative Spleißen des α -Tropomyosin-Gens zu haben. Dazu ist jedoch anzumerken, dass der Darm als heterogenes Gewebe mit Glattmuskel-Anteil einen sehr hohen PTB-Proteingehalt im Vergleich zur Lunge, Uterus und dem Herzen aufweist (Gooding et al., 2003). Gleichzeitig ist der Darm auch eines der wenigen Glattmuskel-Gewebe in denen die smPTB-Isoform (Glattmuskel-PTB) in geringem Maße exprimiert wird, für die ebenfalls ein Repressor-Effekt auf das Exon3 von α -Tropomyosin nachgewiesen wurde (Gooding et al., 2003). Möglicherweise ist Raver1 als Ligand von PTB in diesem Gewebe nicht essentiell für die Repression des Nicht-Muskel-spezifischen Exons, da PTB durch seinen hohen Proteingehalt diese Funktion alleine übernehmen kann.

Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten RNAi-Experimente weisen auf einen synergistischen, repressiven Effekt von PTB und Raver1 bei der alternativen Prozessierung der α -Tropomyosin-RNA hin (Abbildung 39). Da in der Literatur bisher keine PTB-„knock out“-Maus beschrieben wurde, ist der RNAi-vermittelte „knock down“ von PTB das einzige System, um die endogene Spleiß-Aktivität dieses Proteins zu untersuchen. Vor allem in den verwendeten HeLa-Zellen konnte ein deutlicher Repressor-Effekt von PTB auf das Nicht-Muskel-spezifische Exon3 beobachtet werden, der durch einen signifikanten Anstieg eben dieses Exons in PTBsiRNA behandelten Zellen gekennzeichnet war. Gleichzeitig kam es zu einer ebenfalls statistisch bedeutsamen Abnahme des SM-Exons. Indirekt konnte über eine entsprechende Repression des Glattmuskel-spezifischen Exon2 die Repressor-Funktion von PTB erstmalig auch in HEK-Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass das alternative Spleißen der α -Tropomyosin-RNA tatsächlich durch einen repressiven Einfluss von PTB vermittelt wird. Auch in Raver1-siRNA behandelten HeLa-Zellen wurde eine erhöhte Inkorporation des Exon3 in die mRNA beobachtet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Raver1 in der Tat einen positiven Effekt auf die PTB-Spleißaktivität hat, die durch

Reduktion des zellulären Raver1-Proteingehalts nach siRNA-Behandlung gemindert wird. In HEK-Zellen kommt es vorrangig zu einer Reduktion des Glattmuskel-spezifischen Exon2, die ebenfalls, wenn auch indirekt eine Beteiligung von Raver1 an der Repression von Exon3 vermuten lässt. Da in diesen Zellen ein ähnliches Spleißmuster auch für PTBsiRNA behandelte Kulturen zu beobachten war, scheint sich in HEK-Zellen nur die Verschiebung der schwächer exprimierten SM-Isoform eindeutig nachweisen zu lassen. Die simultane Erhöhung der ohnehin stark exprimierten NM-Isoform war über die qPCR-Analysen jedenfalls in beiden Ansätzen für HEK-Zellen nicht nachweisbar.

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals eine kooperative Beteiligung von PTB und Raver1 an endogenen Spleißprozessen gezeigt werden. Sowohl die *in vivo* Analysen als auch die zellulären Untersuchungen nach siRNA-Behandlung belegen einen co-repressiven Effekt von Raver1 auf die durch PTB vermittelte Repression des α -Tropomyosin Exon3. Im Gegensatz zu den gezeigten Analysen des Fas-Rezeptors, scheinen für das alternative Spleißen der RNA des α -Tropomyosin-Gens im Menschen und in der Maus dieselben Faktoren, Raver1 und PTB, für die Prozessierung verantwortlich zu sein. Darüber hinaus stimmen die *in vivo* Daten mit vorherigen *in vitro* Analysen an Minigenen überein (Gromak et al., 2003a; Rideau et al., 2006). Es bleibt allerdings zu klären, worauf sich letztendlich die gewebespezifischen Unterschiede, die einen unterschiedlich starken Einfluss von Raver1 implizieren, manifestieren (siehe auch Kapitel 4.3.3).

4.3.2.3 FGF-Rezeptor2

Die Spleiß-Analysen des FGF-Rezeptor2 (FGF-R2) stellen ein weiteres Beispiel für Gewebespezifische Spleißprozesse dar. Durch das alternative Spleißen der Exons IIIb und IIIc wird entweder eine epitheliale Variante oder mesenchymale Isoform des Proteins gebildet, die sich durch unterschiedliche Bindungsspezifitäten hinsichtlich ihrer FGF-Liganden auszeichnen (Ornitz et al., 1996). Es ist bekannt, dass PTB dabei als Repressor auf das epitheliale ExonIIIb wirkt, wodurch selbiges vermindert in die mRNA inkorporiert wird (Carstens et al., 2000). Eine detaillierte Untersuchung der Raver1-Beteiligung am Spleißen des FGF-R2 wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem auf Grund der starken Verschiebungen in den initialen Analysen durchgeführt. So kam es im Hirn der Raver1-KO-Mäuse zu einer signifikanten Repression des mesenchymalen ExonIIIc und einer verstärkten Inkorporation des epithelialen ExonIIIb (Abbildung 34). Diese Verschiebungen entsprechen der Co-Repressor-Theorie, da

durch den Verlust von Raver1 die co-repressive Wirkung des Proteins fehlt und dadurch mehr epithelialer FGF-R2 gebildet wird. Im Darm hingegen kommt es zu einer genau entgegengesetzten Verschiebung beider Isoformen, da hier mehr mesenchymaler FGF-R2 gebildet wird, wohingegen die epitheliale Variante verstärkt unterdrückt wird. Letztere Spleißverschiebung wurde zumindest in ähnlicher Weise in den anderen untersuchten, nicht-neuronalen Geweben festgestellt. Allerdings wurde hier lediglich eine Reduktion der epithelialen Variante ohne gleichzeitige offensichtliche Beeinflussung der mesenchymalen Isoform beobachtet (Abbildung 37).

Eine mögliche Ursache dieser teilweise konträren Spleißmuster in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben könnte die unterschiedliche Expression von PTB und PTB-homologen Proteinen in den einzelnen Geweben sein. Zusätzlich zu den drei Isoformen von PTB existieren mindestens zwei weitere Proteine, die als PTB-Homologe fungieren könnten: das neuronale PTB (nPTB) und das hnRNP ROD1 („regulator of differentiation“). Beide Proteine besitzen eine Sequenzübereinstimmung von 70-80 % zu PTB (Boutz et al., 2007). Im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten PTB, das in bisher allen untersuchten Entwicklungsstadien und Zelltypen identifiziert wurde, lokalisiert nPTB vorrangig in neuronalen Strukturen (Markovtsov et al., 2000; Robinson et al., 2008) wohingegen ROD1 in hämatopoetischen Zellen exprimiert ist (Yamamoto et al., 1999). Für nPTB konnten bereits ähnliche Funktionen wie für PTB beim alternativen Spleißen identifiziert werden (Boutz et al., 2007; Makeyev et al., 2007), wohingegen die funktionelle Bedeutung von ROD1 noch ungeklärt ist (Yamamoto et al., 1999). Ein drittes PTB-Homolog, das so genannte smPTB (Glattmuskel-PTB) konnte bisher ausschließlich in Nagern nachgewiesen werden (Gooding et al., 2003). Ob Raver1 auch mit einem der PTB-Homologe interagieren kann, ist nicht bekannt. Andererseits wurde bisher auch nicht untersucht, ob Raver1 ausschließlich mit PTB in alternativen Spleißprozessen wechselwirkt oder auch an weitere spleiß-regulierende Proteine binden kann. Es wäre durchaus denkbar, dass auch Raver1 weitere Bindungspartner besitzt, die an alternativen Spleißprozessen beteiligt sind und wie bereits für die Prozessierung des Fas-Rezeptors diskutiert wurde (Abschnitt 4.3.1).

Gerade für das alternative Spleißen des FGF-R2 konnten bereits mehrere regulierende Proteine identifiziert werden. So bewirken Fox1, Fox2 und Tia-1 als Antagonisten von PTB die Aktivierung des epithelialen ExonIIIb (Baraniak et al., 2006; Del Gatto-Konczak et al., 2000; Newman et al., 2006). Im Gegensatz dazu hat hnRNP A1 eine ähnlich reprimierende Wirkung auf das IIIb-Exon wie PTB (Del Gatto-Konczak et al., 1999). Allerdings konkurrieren hnRNP A1 und PTB dabei nicht um dieselbe Bindungsstellen auf der RNA, da

PTB über drei verschiedene ISS das ExonIIIb reprimiert wohingegen hnRNP A1 über die Bindung an eine ESS im ExonIIIb seine Repressorfunktion ausübt (Wagner et al., 2005). Aus dieser Konstellation ergeben sich zwei denkbare Szenarien, um eine Beteiligung von Raver1 an der Prozessierung der FGF-R2-RNA entgegen der Co-Repressor-Theorie zu erklären. Zum einen könnte Raver1 sowohl mit PTB als auch hnRNP A1 interagieren, die beide eine Repression des ExonIIIb wenn auch über Bindung an unterschiedliche regulatorische Sequenzbereiche bewirken. Dabei müsste Raver1 einen entgegen gesetzten Einfluss auf die Spleißaktivität der beiden Proteine nehmen: Bei Anwesenheit von Raver1 würde PTB an seine intronischen Bindungssequenzen binden und das ExonIIIb reprimieren, wobei Raver1 als Co-Repressor fungiert. Durch den Verlust des Raver1-Proteins in den Raver1-KO-Mäusen wäre der PTB-Raver1-Komplex gestört und PTB könnte nur mit verminderter Effizienz spleißen. HnRNP A1 hingegen müsste in Anwesenheit von Raver1 in seiner Aktivität negativ beeinträchtigt werden, so dass nach Verminderung der Raver1-Expression das Protein eine höhere Repressor-Aktivität erlangt, die zu einer selbst gegenüber der PTB-vermittelten Prozessierung die ExonIIIb-Inkorporation verstärkt reprimiert. Alternativ könnte Raver1 auch bevorzugt mit einem PTB-Antagonisten kooperieren, wie bereits beim alternativen Spleißen des Fas-Rezeptors für den PTB-Antagonisten Tia-1 diskutiert wurde (Abschnitt 4.3.1). Im Falle des Raver1 Verlustes würde dann die aktivierende Funktion von Tia-1 auf das ExonIIIb gestört werden und somit den repressiven Effekt von PTB indirekt verstärken.

In Bezug auf das Spleißen des humanen FGF-R2 geben auch die zellulären Analysen an HeLa- und HEK-Zellen keinen genauen Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von Raver1. Dabei ist anzumerken, dass sowohl die HeLa- als auch die HEK-Zellen, in denen durch PTBsiRNA der PTB-Proteingehalt reduziert wurde ohnehin nur eine sehr geringe Repressor-Aktivität des PTB-Proteins aufwiesen (Abbildung 41). Diese allgemein geringe repressive Wirkung von PTB auf das ExonIIIb des FGF-R2 wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (Wagner & Garcia-Blanco, 2002). In Raver1-siRNA behandelten Zellen kommt es lediglich zu einer signifikanten Repression des mesenchymalen ExonIIIc. Indirekt entspricht dieses Spleißmuster zwar eher der Co-Repressor-Theorie, stellt aber keinen eindeutigen Beweis dar.

Letztendlich konnte ein eindeutiger Co-Repressor-Effekt von Raver1 auf das alternative Spleißen des FGF-R2-Gens nur im Hirn von Mäusen nachgewiesen werden. In allen anderen Geweben führt die Inaktivierung des Raver1-Gens zu einem gegenteiligen Effekt. Diese Daten unterstreichen nochmals die Gewebespezifität der alternativen RNA-Prozessierung und ihre Vielfalt auf die in diese Prozesse eingebundenen Proteine. Letztendlich muss sogar in

Frage gestellt werden, ob die alternative Inkorporation der Exons IIIb und IIIc tatsächlich überwiegend durch PTB kontrolliert wird wie auf Grund von Minigen-Analysen postuliert wurde (Carstens et al., 2000; Wagner & Garcia-Blanco 2002; Wagner et al., 2005).

4.3.3 Die Verschiebung alternativer Spleißmuster durch Raver1

Die Analyse der Bedeutung von Raver1 für alternative Spleißprozesse von drei Genen, die als Zielgene von PTB beschrieben wurden, basierte im Wesentlichen auf der Annahme, dass Raver1 vorrangig über seine Assoziation mit PTB an RNA rekrutiert wird und dadurch die Spleißaktivität von PTB moduliert. Die molekularen Grundlagen dieser Modulation sind jedoch weitestgehend unbekannt. Über das MS2-System konnte zwar nach aktiver Rekrutierung von Raver1 an ein modifiziertes α -Tropomyosin-Minigen eine „Repressor-Domäne“ identifiziert werden, die eine von PTB unabhängige Repression von Exon3 bewirkte (Rideau et al., 2006), die Übertragbarkeit dieses Systems auf die *in vivo* Situation bleibt jedoch fraglich (siehe auch 4.3.1). Die derzeit einzigen Hinweise, wie Raver-Proteine die Spleißaktivität von PTB modulieren könnten liefern *in vitro* Analysen, in denen die Bindung von PTB in Anwesenheit steigender Raver1- und Raver2-Konzentrationen untersucht wurde (Dissertation B. Henneberg, 2006). Hierbei zeigte sich, dass in Anwesenheit beider rekombinanter Raver-Proteine die Wechselwirkung von PTB mit radioaktiv markierten RNA-Molekülen verstärkt wird. Nach einem Modellvorschlag könnten die Raver-Proteine an die RNA rekrutiert werden nachdem PTB an die polypyrimidin-reichen Sequenzen UCUU CUCUCU und UUCUCU gebunden hat (Liu et al., 2002). Alternativ könnten sich zunächst PTB-Raver-Komplexe bilden, die anschließend über PTB an die polypyrimidin-reichen Sequenzen der RNA binden. Über die Bindung an Raver1 (oder Raver2) könnte darüber hinaus auch die Bildung höherer Komplexe begünstigt werden, in die mehrere PTB-Moleküle rekrutiert werden (Dissertation B. Henneberg, 2006) und die dann eine Schlaufenbildung in der RNA unterstützen (Abbildung 5).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Daten zum alternativen Spleißen des FGF-R2 lassen darüber hinaus vermuten, dass die Beteiligung von Raver1 an der RNA-Prozessierung nicht auf PTB beschränkt sein muss, sondern beispielsweise auch die Wechselwirkung mit zu PTB antagonistisch wirkenden Faktoren beinhalten kann. Zumindest für Raver2 konnte mit CELF4 ein weiterer Bindungspartner identifiziert werden (Diplomarbeit N. Kieper, 2007) dessen Assoziation mit Raver2 durch Mutation der PTB-

Bindungsmotive nicht beeinträchtigt wird (Diplomarbeit S. Becke, 2008). CELF4 ist ein weiteres Mitglied der hnRNP-Familie und ein Regulator alternativer Spleißprozesse (Ladd et al., 2001; Barreau et al., 2006). Für das alternativen Spleißen des α -actinin-Gens konnte in Minigen-Analysen eine antagonistische Funktion des Proteins zu PTB nachgewiesen werden (Gromak et al., 2003b). Die Bindung an zwei auf dasselbe Spleißereignis wirkende Faktoren würde Raver-Proteinen die Funktion eines molekularen Schalters zuweisen. In Abhängigkeit des zellulären Kontext könnten Raver-Proteine die relative Aktivität antagonistischer Spleißfaktoren zueinander dahingehend verschieben, dass ein Spleißvorgang begünstigt wird. Eine Möglichkeit wäre die bereits für PTB diskutierte Modulation der RNA-Bindung. Es ist dabei denkbar, dass durch konformationelle Änderungen des Spleißfaktors nach Bindung von Raver-Proteinen die Aktivität des Spleißfaktors verändert wird.

Insgesamt ist der Einfluss von Raver1 auf den gesamten Organismus jedoch gering, denn die Raver1-KO-Mäuse sind im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren phänotypisch unauffällig, abgesehen von einer veränderten synaptischen Plastizität hippocampaler Neuronen (Lahmann et al., 2008). Trotzdem bewirkt die Inaktivierung des Raver1-Gens statistisch signifikante Verschiebungen in mehreren PTB-vermittelten Spleißprozessen. Es stellt sich somit die Frage weshalb die veränderten Expressions-Verhältnisse der in dieser Arbeit untersuchten Isoformen von c-src, α -Tropomyosin und FGF-R2 sich phänotypisch nicht deutlicher auf die Raver1-KO-Mäuse auswirken. Diese Frage kann aus zweierlei Perspektiven beantwortet werden:

Zum einen bedeutet die höhere Inkorporation eines alternativen Exons in die mRNA nicht unbedingt auch die erhöhte zelluläre Expression dieser Isoform in dem betreffenden Gewebe, da RNA- und Proteinmenge nicht zwangsweise korrelieren (Tian et al., 2004). Die mRNA-Konzentration stellt nur einen von vielen Parametern für die Translationsaktivität einer Zelle dar. Weitere wichtige Faktoren sind beispielsweise die Ribosomenmenge, die Ribosomenbesetzung durch mRNAs sowie die Degradationsrate der betreffenden mRNA (Brockmann et al., 2007). Wie bereits für c-src diskutiert, kann auch die post-transkriptionelle Regulation über den „NMD-Pathway“ die Proteinexpression stark beeinflussen (Lejeune & Maquat 2005; Rehwinkel et al., 2005).

Des Weiteren muss man auch in Erwägung ziehen, welchen Einfluss die analysierten Ziel-Proteine überhaupt für den Organismus haben. So weisen beispielsweise bei den „knock out“ Tieren der untersuchten PTB-Zielgene nur die homozygoten Tiere einen abweichenden Phänotyp von Wildtyp-Mäusen auf. Der homozygote „knock out“ des c-src-Gens ist letal, die Embryonen sterben zwischen E 9,5 und E 10,5. Heterozygote Tiere sind hingegen lebensfähig

und phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Imamoto et al., 1993). Auch homozygote α -Tropomyosin-KO-Mäuse sterben zwischen E 9.5 und E 13.5, wohingegen heterozygote Tiere zwar eine Reduktion in der α -Tropomyosin -Proteinexpression aufweisen sonst aber phänotypisch ebenfalls unauffällig sind (Blanchard et al., 1997). FGF-R2-defiziente Mäuse zeigen eine vergleichsweise frühe Sterblichkeit während der Embryonalphase bei etwa E 5, allerdings ebenfalls nur im homozygoten Genotyp (Arman et al., 1998). Homozygote „Knock out“-Mäuse, in denen lediglich die epitheliale Isoform des FGF-R2 deletiert wurde, sind bis zur Geburt lebensfähig, weisen jedoch Defekte in der Organogenese der Hypophyse, der Gliedmaßen und der Lunge auf. Heterozygote Tiere hingegen zeigen wiederum keine Veränderungen im Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (De Moerlooze et al., 2000). Im Kontext dieser Befunde lässt sich auch der unauffällige Phänotyp der Raver1-KO-Mäuse erklären. Der Verlust von Raver1 führt vor allem zu einer Verschiebung der relativen Expression von Spleißvarianten, nicht aber zu einer kompletten Inaktivierung der Zielproteine. Darüber hinaus ist die Modulation der Spleißereignisse nach Inaktivierung des Raver1-Gens nicht so gravierend, dass die Bildung einer Isoform komplett unterdrückt wird. Selbst im Vergleich zu dem Isoform-spezifischen „knock out“ des FGF-Rezeptors stellt der Verlust von Raver1 daher ein gut tolerables Ereignis dar, so dass für Raver1-KO-Mäuse kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp zu erwarten ist.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Modulation der Raver1-Expression auch *in vivo* einen Einfluss auf alternative Spleißprozesse von bekannten PTB-Zielgenen hat. Die Analyse endogener Spleißmuster lässt dabei allerdings vermuten, dass Raver1 nicht ausschließlich als Co-Repressor von PTB wirkt, sondern möglicherweise mit zu PTB antagonistisch wirkenden Spleißfaktoren interagiert und somit als molekularer Schalter zwischen zwei Spleiß-Ereignissen fungieren könnte. Weiterführende Analysen sollten daher vor allem die nach wie vor unklaren molekularen Mechanismen untersuchen, anhand derer Raver1 an der RNA-Prozessierung beteiligt ist.

Zunächst sollten hierfür weitere PTB-Zielgene in den Raver1-KO-Mäusen untersucht werden, um die vorliegende Studie zu komplementieren. Hierbei ist vor allem auch α -actinin zu nennen, für das bereits erste Spleißverschiebungen *in vivo* in dieser Arbeit beobachtet wurden.

In vitro Analysen an Minigenen (Spellman et al., 2005) hatten zunächst keine eindeutigen Hinweise gegeben, dass das Spleißen dieser RNA durch Raver1 beeinflusst wird. In Anbetracht der Tatsache, dass diese Analysen nur bedingt die physiologische Situation widerspiegeln erscheint eine detaillierte Analyse sinnvoll. Auf Grund der hohen Gewebespezifität der analysierten Spleißprozesse ist denkbar, dass auch für die in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigten Gene eine Modulation durch die Inaktivierung des Raver1-Gens erfolgt. Diese Studien würden zudem weitere Hinweise darauf geben, wie Raver1 in diese Prozesse eingebunden ist. In diesem Zusammenhang sollte auch gezielt untersucht werden, ob Raver1 außer PTB mit weiteren Spleißfaktoren der hnRNP- oder SR-Proteinfamilie eingehen kann. Hierfür würde sich unter anderem das Yeast-Two-Hybrid-System anbieten, das bereits mehrfach erfolgreich in der Analyse von Raver1 eingesetzt werden konnte (Hüttelmaier et al., 2001). Für Raver2 konnte mit CELF4 bereits ein PTB-Antagonist in diesem System identifiziert werden (Diplomarbeit N. Kieper, 2007).

Auch wenn alle bisherigen Daten dafür sprechen, dass Raver1 nur indirekt an RNA rekrutiert wird (Dissertation B. Henneberg, 2006), obwohl die RRM's prinzipiell in der Lage sind, an RNA zu binden, ist es somit nicht ausgeschlossen, dass in einem noch näher zu definierenden zellulären Kontext Raver1 auch direkt an RNA rekrutiert werden kann. *In vivo* CLIP-Analysen von verschiedenen Geweben könnten zunächst Aufschluss darüber geben, ob Raver1 tatsächlich gewebespezifisch an RNA bindet. Zum einen könnten dann die Ziel-RNAs einer solchen Interaktion identifiziert werden, zum anderen sollte das aus diesen Geweben isolierte Raver1-Protein auf mögliche posttranslationale Modifikationen (z.B. über Massenspektrometrie) hin untersucht werden, die eine RNA-Bindung begünstigen könnten.

Da Raver2 ebenfalls mit PTB über ähnliche Bindungsmotive wie Raver1 interagiert und wie letzteres Protein auch in isolierten Spleißosom-Komplexen von HeLa-Zellen gefunden wurde (Sharma et al., 2008), könnten vergleichende Analysen beider Raver-Proteine ebenfalls von Vorteil sein. Im Hinblick auf den milden neuronalen Phänotyp der Raver1-KO-Mäuse könnte hierbei auch ein Raver2 „knock out“ weitere Einblicke vermitteln, da das Protein überwiegend in neuronalen Strukturen exprimiert wird (Kleinhenz et al., 2005).

In demselben Kontext könnte auch näher untersucht werden, durch welchen zellulären Mechanismus Raver1 Einfluss auf die Expression von c-src nimmt. Hierbei ist sowohl ein verstärkter Abbau der mRNA über NMD als auch eine Beteiligung von Raver1 an Transkriptionsprozessen denkbar. Die bereits gezeigte Wechselwirkung von Raver1 mit (Kern-)Aktin, für das bereits eine Assoziation mit hnRNP-Mitgliedern nachgewiesen wurde

(Percipalle et al., 2002) wäre für Raver1 eine Beteiligung an Transkriptionsprozessen durchaus möglich.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- Abelson, J., Trotta, C. R., and Li, H. (1998). tRNA splicing. *J Biol Chem* 273, 12685-12688.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Akamatsu, W., Okano, H. J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R. B., and Okano, H. (1999). Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9885-9890.
- Amir-Ahmady, B., Boutz, P. L., Markovtsov, V., Phillips, M. L., and Black, D. L. (2005). Exon repression by polypyrimidine tract binding protein. *Rna* 11, 699-716.
- Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., Heath, J. K., and Lonai, P. (1998). Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5082-5087.
- Ashiya, M., and Grabowski, P. J. (1997). A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *Rna* 3, 996-1015.
- Auweter, S. D., and Allain, F. H. (2008). Structure-function relationships of the polypyrimidine tract binding protein. *Cell Mol Life Sci* 65, 516-527.
- Balvay, L., and Fiszman, M. Y. (1994). [Analysis of the diversity of tropomyosin isoforms]. *C R Seances Soc Biol Fil* 188, 527-540.
- Baraniak, A. P., Chen, J. R., and Garcia-Blanco, M. A. (2006). Fox-2 mediates epithelial cell-specific fibroblast growth factor receptor 2 exon choice. *Mol Cell Biol* 26, 1209-1222.
- Barreau, C., Paillard, L., Mereau, A., and Osborne, H. B. (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* 88, 515-525.
- Berglund, J. A., Abovich, N., and Rosbash, M. (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev* 12, 858-867.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blanchard, E. M., Iizuka, K., Christe, M., Conner, D. A., Geisterfer-Lowrance, A., Schoen, F. J., Maughan, D. W., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (1997). Targeted ablation of the murine alpha-tropomyosin gene. *Circ Res* 81, 1005-1010.

- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1474.
- Bonen, L., and Vogel, J. (2001). The ins and outs of group II introns. *Trends Genet* 17, 322-331.
- Boutz, P. L., Stoilov, P., Li, Q., Lin, C. H., Chawla, G., Ostrow, K., Shiue, L., Ares, M., Jr., and Black, D. L. (2007). A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons. *Genes Dev* 21, 1636-1652.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bridgham, J. T., and Johnson, A. L. (2001). Expression and regulation of Fas antigen and tumor necrosis factor receptor type I in hen granulosa cells. *Biol Reprod* 65, 733-739.
- Brockmann, R., Beyer, A., Heinisch, J. J., and Wilhelm, T. (2007). Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? *PLoS Comput Biol* 3, e57.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., and Short, J. M. (1987). From genes to clones: An introduction to gene technology. Weinheim VCH.
- Caceres, J. F., and Kornblihtt, A. R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18, 186-193.
- Carstens, R. P., Wagner, E. J., and Garcia-Blanco, M. A. (2000). An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol* 20, 7388-7400.
- Castelo-Branco, P., Furger, A., Wollerton, M., Smith, C., Moreira, A., and Proudfoot, N. (2004). Polypyrimidine tract binding protein modulates efficiency of polyadenylation. *Mol Cell Biol* 24, 4174-4183.
- Cech, T. R. (1988). Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis--a review. *Gene* 73, 259-271.
- Chan, R. C., and Black, D. L. (1997). The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell-specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream. *Mol Cell Biol* 17, 4667-4676.
- Charlet, B. N., Logan, P., Singh, G., and Cooper, T. A. (2002). Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol Cell* 9, 649-658.
- Chasin, L. A. (2007). Searching for splicing motifs. *Adv Exp Med Biol* 623, 85-106.
- Chen, Y., and Varani, G. (2005). Protein families and RNA recognition. *Febs J* 272, 2088-2097.
- Chen, Y. I., Moore, R. E., Ge, H. Y., Young, M. K., Lee, T. D., and Stevens, S. W. (2007). Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res* 35, 3928-3944.
- Chou, M. Y., Underwood, J. G., Nikolic, J., Luu, M. H., and Black, D. L. (2000). Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol Cell* 5, 949-957.

- Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., and Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.
- Clark, T. A., Schweitzer, A. C., Chen, T. X., Staples, M. K., Lu, G., Wang, H., Williams, A., and Blume, J. E. (2007). Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biol* 8, R64.
- Clery, A., Blatter, M., and Allain, F. H. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18, 290-298.
- Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- Cote, C. A., Gautreau, D., Denegre, J. M., Kress, T. L., Terry, N. A., and Mowry, K. L. (1999). A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell* 4, 431-437.
- De Moerloose, L., Spencer-Dene, B., Revest, J. M., Hajihosseini, M., Rosewell, I., and Dickson, C. (2000). An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127, 483-492.
- Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C. F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M. C., Stevenin, J., and Breathnach, R. (2000). The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol Cell Biol* 20, 6287-6299.
- Del Gatto-Konczak, F., Olive, M., Gesnel, M. C., and Breathnach, R. (1999). hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol Cell Biol* 19, 251-260.
- Farrants, A. K. (2008). Chromatin remodelling and actin organisation. *FEBS Lett* 582, 2041-2050.
- Fedorova, O., and Zingler, N. (2007). Group II introns: structure, folding and splicing mechanism. *Biol Chem* 388, 665-678.
- Feroze-Merzoug, F., Berquin, I. M., Dey, J., and Chen, Y. Q. (2002). Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and beta-actin in quantitative RNA analyses. *Biotechniques* 32, 776-778, 780, 782.
- Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P., and Valcarcel, J. (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 6, 1089-1098.
- Frangioni, J. V., and Neel, B. G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210, 179-187.
- Fribourg, S., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Conti, E. (2003). A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. *Nat Struct Biol* 10, 433-439.
- Garcia-Blanco, M. A., Jamison, S. F., and Sharp, P. A. (1989). Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev* 3, 1874-1886.
- Ghetti, A., Pinol-Roma, S., Michael, W. M., Morandi, C., and Dreyfuss, G. (1992). hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res* 20, 3671-3678.

- Gil, A., Sharp, P. A., Jamison, S. F., and Garcia-Blanco, M. A. (1991). Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes Dev* 5, 1224-1236.
- Gooding, C., Kemp, P., and Smith, C. W. (2003). A novel polypyrimidine tract-binding protein paralog expressed in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 278, 15201-15207.
- Gooding, C., Roberts, G. C., Moreau, G., Nadal-Ginard, B., and Smith, C. W. (1994). Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon. *Embo J* 13, 3861-3872.
- Gooding, C., Roberts, G. C., and Smith, C. W. (1998). Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *Rna* 4, 85-100.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17, 100-107.
- Gromak, N., Matlin, A. J., Cooper, T. A., and Smith, C. W. (2003). Antagonistic regulation of alpha-actinin alternative splicing by CELF proteins and polypyrimidine tract binding protein. *Rna* 9, 443-456.
- Gromak, N., Rideau, A., Southby, J., Scadden, A. D., Gooding, C., Huttelmaier, S., Singer, R. H., and Smith, C. W. (2003). The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing. *Embo J* 22, 6356-6364.
- Gromak, N., and Smith, C. W. (2002). A splicing silencer that regulates smooth muscle specific alternative splicing is active in multiple cell types. *Nucleic Acids Res* 30, 3548-3557.
- Hahm, B., Kim, Y. K., Kim, J. H., Kim, T. Y., and Jang, S. K. (1998). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol* 72, 8782-8788.
- Hamilton, B. J., Genin, A., Cron, R. Q., and Rigby, W. F. (2003). Delineation of a novel pathway that regulates CD154 (CD40 ligand) expression. *Mol Cell Biol* 23, 510-525.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harrison, P. M., Kumar, A., Lang, N., Snyder, M., and Gerstein, M. (2002). A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res* 30, 1083-1090.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030.

- Hofmann, W. A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G. M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J. A., Lessard, J. L., Hope, T. J., et al. (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 6, 1094-1101.
- Hu, P., Wu, S., and Hernandez, N. (2004). A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 18, 3010-3015.
- Huang, S., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., and Spector, D. L. (1997). The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus. *J Cell Biol* 137, 965-974.
- Huang, S., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., and Spector, D. L. (1998). The perinucleolar compartment and transcription. *J Cell Biol* 143, 35-47.
- Huttelmaier, S., Illenberger, S., Grosheva, I., Rudiger, M., Singer, R. H., and Jockusch, B. M. (2001). Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol* 155, 775-786.
- Imamoto, A., and Soriano, P. (1993). Disruption of the *csk* gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell* 73, 1117-1124.
- Izquierdo, J. M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D., and Valcarcel, J. (2005). Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 19, 475-484.
- Izquierdo, J. M., and Valcarcel, J. (2007). Fas-activated serine/threonine kinase (FAST K) synergizes with TIA-1/TIAR proteins to regulate Fas alternative splicing. *J Biol Chem* 282, 1539-1543.
- Jin, W., Bruno, I. G., Xie, T. X., Sanger, L. J., and Cote, G. J. (2003). Polypyrimidine tract-binding protein down-regulates fibroblast growth factor receptor 1 alpha-exon inclusion. *Cancer Res* 63, 6154-6157.
- Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., and Inoue, K. (2003). A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *Embo J* 22, 905-912.
- Jockusch, B. M., Huttelmaier, S., and Illenberger, S. (2003). From the nucleus toward the cell periphery: a guided tour for mRNAs. *News Physiol Sci* 18, 7-11.
- Keryer-Bibens, C., Barreau, C., and Osborne, H. B. (2008). Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. *Biol Cell* 100, 125-138.
- Kleinhenz, B., Fabienke, M., Swiniarski, S., Wittenmayer, N., Kirsch, J., Jockusch, B. M., Arnold, H. H., and Illenberger, S. (2005). Raver2, a new member of the hnRNP family. *FEBS Lett* 579, 4254-4258.
- Koloteva-Levine, N., Amichay, M., and Elroy-Stein, O. (2002). Interaction of hnRNP-C1/C2 proteins with RNA: analysis using the yeast three-hybrid system. *FEBS Lett* 523, 73-78.
- Kondrashov, F. A., and Koonin, E. V. (2003). Evolution of alternative splicing: deletions, insertions and origin of functional parts of proteins from intron sequences. *Trends Genet* 19, 115-119.

- Kopp, K., and Huang, S. (2005). Perinucleolar compartment and transformation. *J Cell Biochem* 95, 217-225.
- Krammer, P. H., Dhein, J., Walczak, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P. T., Knipping, E., Westendorp, M. O., and et al. (1994). The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev* 142, 175-191.
- Krecic, A. M., and Swanson, M. S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11, 363-371.
- Kremerskothen, J., Teber, I., Wendholt, D., Liedtke, T., Bockers, T. M., and Barnekow, A. (2002). Brain-specific splicing of alpha-actinin 1 (ACTN1) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 678-681.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., and Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31, 147-157.
- Ladd, A. N., Charlet, N., and Cooper, T. A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 1285-1296.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lahmann, I., Fabienke, M., Henneberg, B., Pabst, O., Vauti, F., Minge, D., Illenberger, S., Jockusch, B. M., Korte, M., and Arnold, H. H. (2008). The hnRNP and cytoskeletal protein raver1 contributes to synaptic plasticity. *Exp Cell Res* 314, 1048-1060.
- Lamond, A. I. (1993). The spliceosome. *Bioessays* 15, 595-603.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lau, C. K., Diem, M. D., Dreyfuss, G., and Van Duyne, G. D. (2003). Structure of the Y14-Magoh core of the exon junction complex. *Curr Biol* 13, 933-941.
- Le Sommer, C., Lesimple, M., Mereau, A., Menoret, S., Allo, M. R., and Hardy, S. (2005). PTB regulates the processing of a 3'-terminal exon by repressing both splicing and polyadenylation. *Mol Cell Biol* 25, 9595-9607.
- Lejeune, F., and Maquat, L. E. (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17, 309-315.
- Levy, J. B., Dorai, T., Wang, L. H., and Brugge, J. S. (1987). The structurally distinct form of pp60c-src detected in neuronal cells is encoded by a unique c-src mRNA. *Mol Cell Biol* 7, 4142-4145.
- Lewis, B. P., Green, R. E., and Brenner, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 189-192.

- Li, B., and Yen, T. S. (2002). Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem* 277, 10306-10314.
- Li, Q., Lee, J. A., and Black, D. L. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* 8, 819-831.
- Lin, C. H., and Patton, J. G. (1995). Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *Rna* 1, 234-245.
- Lin, J. C., and Tarn, W. Y. (2005). Exon selection in alpha-tropomyosin mRNA is regulated by the antagonistic action of RBM4 and PTB. *Mol Cell Biol* 25, 10111-10121.
- Lin, J. J., Eppinga, R. D., Warren, K. S., and McCrae, K. R. (2008). Human tropomyosin isoforms in the regulation of cytoskeleton functions. *Adv Exp Med Biol* 644, 201-222.
- Liu, H., Zhang, W., Reed, R. B., Liu, W., and Grabowski, P. J. (2002). Mutations in RRM4 uncouple the splicing repression and RNA-binding activities of polypyrimidine tract binding protein. *Rna* 8, 137-149.
- Lopez, A. J. (1998). Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet* 32, 279-305.
- Loraine, A. E., Helt, G. A., Cline, M. S., and Siani-Rose, M. A. (2002). Protein-based analysis of alternative splicing in the human genome. *Proc IEEE Comput Soc Bioinform Conf* 1, 118-124.
- Lorenz, M. (2009). Visualizing protein-RNA interactions inside cells by fluorescence resonance energy transfer. *Rna* 15, 97-103.
- Lou, H., Helfman, D. M., Gagel, R. F., and Berget, S. M. (1999). Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol* 19, 78-85.
- Ma, X., and He, F. (2003). Advances in the study of SR protein family. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 1, 2-8.
- Makarov, E. M., Makarova, O. V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C. L., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2002). Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* 298, 2205-2208.
- Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27, 435-448.
- Maniatis, T., and Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418, 236-243.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. H. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J* 272, 2118-2131.
- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fisette, J. F., Revil, T., and Chabot, B. (2007). hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol* 623, 123-147.
- Matera, A. G., Frey, M. R., Margelot, K., and Wolin, S. L. (1995). A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol* 129, 1181-1193.

- Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 386-398.
- McGlinchy, N. J., and Smith, C. W. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* 33, 385-393.
- Melton, A. A., Jackson, J., Wang, J., and Lynch, K. W. (2007). Combinatorial control of signal-induced exon repression by hnRNP L and PSF. *Mol Cell Biol* 27, 6972-6984.
- Mitchell, S. A., Spriggs, K. A., Bushell, M., Evans, J. R., Stoneley, M., Le Quesne, J. P., Spriggs, R. V., and Willis, A. E. (2005). Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes Dev* 19, 1556-1571.
- Modafferi, E. F., and Black, D. L. (1997). A complex intronic splicing enhancer from the c-src pre-mRNA activates inclusion of a heterologous exon. *Mol Cell Biol* 17, 6537-6545.
- Mollet, I., Barbosa-Morais, N. L., Andrade, J., and Carmo-Fonseca, M. (2006). Diversity of human U2AF splicing factors. *Febs J* 273, 4807-4816.
- Mulligan, G. J., Guo, W., Wormsley, S., and Helfman, D. M. (1992). Polypyrimidine tract binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA. *J Biol Chem* 267, 25480-25487.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A., and Mann, M. (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20, 46-50.
- Newman, E. A., Muh, S. J., Hovhannisyan, R. H., Warzecha, C. C., Jones, R. B., McKeethan, W. L., and Carstens, R. P. (2006). Identification of RNA-binding proteins that regulate FGFR2 splicing through the use of sensitive and specific dual color fluorescence minigene assays. *Rna* 12, 1129-1141.
- Norton, P. A. (1994). Polypyrimidine tract sequences direct selection of alternative branch sites and influence protein binding. *Nucleic Acids Res* 22, 3854-3860.
- Novoyatleva, T., Heinrich, B., Tang, Y., Benderska, N., Butchbach, M. E., Lorson, C. L., Lorson, M. A., Ben-Dov, C., Fehlbaum, P., Bracco, L., et al. (2008). Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing. *Hum Mol Genet* 17, 52-70.
- Oberstrass, F. C., Auweter, S. D., Erat, M., Hargous, Y., Henning, A., Wenter, P., Reymond, L., Amir-Ahmady, B., Pitsch, S., Black, D. L., and Allain, F. H. (2005). Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science* 309, 2054-2057.
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., McEwen, D. G., MacArthur, C. A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271, 15292-15297.
- Pan, Q., Bakowski, M. A., Morris, Q., Zhang, W., Frey, B. J., Hughes, T. R., and Blencowe, B. J. (2005). Alternative splicing of conserved exons is frequently species-specific in human and mouse. *Trends Genet* 21, 73-77.

- Patton, J. G., Porro, E. B., Galceran, J., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. (1993). Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 7, 393-406.
- Pelletier, J. G., and Lacaille, J. C. (2008). Long-term synaptic plasticity in hippocampal feedback inhibitory networks. *Prog Brain Res* 169, 241-250.
- Percipalle, P., Jonsson, A., Nashchekin, D., Karlsson, C., Bergman, T., Guialis, A., and Daneholt, B. (2002). Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res* 30, 1725-1734.
- Perez, I., McAfee, J. G., and Patton, J. G. (1997). Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry* 36, 11881-11890.
- Philimonenko, V. V., Zhao, J., Iben, S., Dingova, H., Kysela, K., Kahle, M., Zentgraf, H., Hofmann, W. A., de Lanerolle, P., Hozak, P., and Grummt, I. (2004). Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 6, 1165-1172.
- Pilipenko, E. V., Viktorova, E. G., Guest, S. T., Agol, V. I., and Roos, R. P. (2001). Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *Embo J* 20, 6899-6908.
- Pinol-Roma, S., and Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730-732.
- Polydorides, A. D., Okano, H. J., Yang, Y. Y., Stefani, G., and Darnell, R. B. (2000). A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6350-6355.
- Pozzoli, U., and Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62, 1579-1604.
- Pyper, J. M., and Bolen, J. B. (1989). Neuron-specific splicing of C-SRC RNA in human brain. *J Neurosci Res* 24, 89-96.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I., and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12, 1231-1245.
- Reed, R., and Palandjian, L. (1997). *Spliceosome assembly*. Oxford IRL Press, Oxford.
- Rehwinkel, J., Letunic, I., Raes, J., Bork, P., and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *Rna* 11, 1530-1544.
- Rideau, A. P., Gooding, C., Simpson, P. J., Monie, T. P., Lorenz, M., Huttelmaier, S., Singer, R. H., Matthews, S., Curry, S., and Smith, C. W. (2006). A peptide motif in Raver1 mediates splicing repression by interaction with the PTB RRM2 domain. *Nat Struct Mol Biol* 13, 839-848.
- Roberts, G. C., and Smith, C. W. (2002). Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Curr Opin Chem Biol* 6, 375-383.
- Robinson, F., Jackson, R. J., and Smith, C. W. (2008). Expression of human nPTB is limited by extreme suboptimal codon content. *PLoS ONE* 3, e1801.
- Romanelli, M. G., Weighardt, F., Biamonti, G., Riva, S., and Morandi, C. (1997). Sequence determinants for hnRNP I protein nuclear localization. *Exp Cell Res* 235, 300-304.

- Rudiger, M., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M. (1997). Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques* 23, 96-97.
- Sakabe, N. J., and de Souza, S. J. (2007). Sequence features responsible for intron retention in human. *BMC Genomics* 8, 59.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Savonet, V., Maenhaut, C., Miot, F., and Pirson, I. (1997). Pitfalls in the use of several "housekeeping" genes as standards for quantitation of mRNA: the example of thyroid cells. *Anal Biochem* 247, 165-167.
- Sawicka, K., Bushell, M., Spriggs, K. A., and Willis, A. E. (2008). Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* 36, 641-647.
- Schmucker, D., and Flanagan, J. G. (2004). Generation of recognition diversity in the nervous system. *Neuron* 44, 219-222.
- Serres, M. H., Gopal, S., Nahum, L. A., Liang, P., Gaasterland, T., and Riley, M. (2001). A functional update of the Escherichia coli K-12 genome. *Genome Biol* 2, RESEARCH0035.
- Sharma, S., Kohlstaedt, L. A., Damianov, A., Rio, D. C., and Black, D. L. (2008). Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat Struct Mol Biol* 15, 183-191.
- Sharp, P. A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell* 77, 805-815.
- Sharp, P. A. (2005). The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem Sci* 30, 279-281.
- Shen, H., Kan, J. L., Ghigna, C., Biamonti, G., and Green, M. R. (2004). A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2. *Rna* 10, 787-794.
- Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., and Wu, C. (2003). Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell* 12, 147-155.
- Singh, R., and Valcarcel, J. (2005). Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 645-653.
- Singh, R., Valcarcel, J., and Green, M. R. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* 268, 1173-1176.
- Singh, R., Valcarcel, J., and Green, M. R. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* 268, 1173-1176.
- Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7, 345-353.
- Slootstra, J. W., Kuperus, D., Pluckthun, A., and Meloen, R. H. (1997). Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5. *Mol Divers* 2, 156-164.

- Slusarczyk, A., and Huang, S. (2008). The Perinucleolar Compartment (PNC): Detection by Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* 463, 161-167.
- Smith, C. W., and Valcarcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 25, 381-388.
- Southby, J., Gooding, C., and Smith, C. W. (1999). Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol* 19, 2699-2711.
- Spellman, R., Rideau, A., Matlin, A., Gooding, C., Robinson, F., McGlincy, N., Grellscheid, S. N., Southby, J., Wollerton, M., and Smith, C. W. (2005). Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors. *Biochem Soc Trans* 33, 457-460.
- Spellman, R., and Smith, C. W. (2006). Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends Biochem Sci* 31, 73-76.
- Staley, J. P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T. A., and Soreq, H. (2005). Function of alternative splicing. *Gene* 344, 1-20.
- Stamm, S., Zhu, J., Nakai, K., Stoilov, P., Stoss, O., and Zhang, M. Q. (2000). An alternative-exon database and its statistical analysis. *DNA Cell Biol* 19, 739-756.
- Stefl, R., and Allain, F. H. (2005). A novel RNA pentaloop fold involved in targeting ADAR2. *Rna* 11, 592-597.
- Stehelin, D., Fujita, D. J., Padgett, T., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1977). Detection and enumeration of transformation-defective strains of avian sarcoma virus with molecular hybridization. *Virology* 76, 675-684.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Swanson, M. S., and Dreyfuss, G. (1988). Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. *Mol Cell Biol* 8, 2237-2241.
- Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., et al. (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3, 960-969.
- Ule, J., Jensen, K. B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A., and Darnell, R. B. (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* 302, 1212-1215.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Villarejo, M. R., and Zabin, I. (1974). Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* 120, 466-474.

- Wagner, E. J., Baraniak, A. P., Sessions, O. M., Mauger, D., Moskowitz, E., and Garcia-Blanco, M. A. (2005). Characterization of the intronic splicing silencers flanking FGFR2 exon IIIb. *J Biol Chem* 280, 14017-14027.
- Wagner, E. J., and Garcia-Blanco, M. A. (2001). Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol* 21, 3281-3288.
- Wagner, E. J., and Garcia-Blanco, M. A. (2002). RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. *Mol Cell* 10, 943-949.
- Wahl, M. C., Will, C. L., and Luhrmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.
- Wang, C., Politz, J. C., Pederson, T., and Huang, S. (2003). RNA polymerase III transcripts and the PTB protein are essential for the integrity of the perinucleolar compartment. *Mol Biol Cell* 14, 2425-2435.
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., and Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470-476.
- Wang, J. B., and Burt, D. R. (1991). Differential expression of two forms of GABAA receptor gamma 2-subunit in mice. *Brain Res Bull* 27, 731-735.
- Wang, Z., and Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna* 14, 802-813.
- Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S. C., Fedorov, A. A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C., et al. (1996). Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 271, 29915-29921.
- Will, C. L., and Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 290-301.
- Wollerton, M. C., Gooding, C., Robinson, F., Brown, E. C., Jackson, R. J., and Smith, C. W. (2001). Differential alternative splicing activity of isoforms of polypyrimidine tract binding protein (PTB). *Rna* 7, 819-832.
- Wollerton, M. C., Gooding, C., Wagner, E. J., Garcia-Blanco, M. A., and Smith, C. W. (2004). Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13, 91-100.
- Xie, J., Lee, J. A., Kress, T. L., Mowry, K. L., and Black, D. L. (2003). Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8776-8781.
- Xing, Y., and Lee, C. (2007). Relating alternative splicing to proteome complexity and genome evolution. *Adv Exp Med Biol* 623, 36-49.
- Yaffe, D., and Saxel, O. (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* 7, 159-166.

- Yamamoto, H., Tsukahara, K., Kanaoka, Y., Jinno, S., and Okayama, H. (1999). Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator. *Mol Cell Biol* 19, 3829-3841.
- Zhang, L., Liu, W., and Grabowski, P. J. (1999). Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB. *Rna* 5, 117-130.
- Zheng, Z. M. (2004). Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci* 11, 278-294.
- Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P., and Reed, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419, 182-185.
- Zieseniss, A., Schroeder, U., Buchmeier, S., Schoenenberger, C. A., van den Heuvel, J., Jockusch, B. M., and Illenberger, S. (2007). Raver1 is an integral component of muscle contractile elements. *Cell Tissue Res* 327, 583-594.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Spleißosom-Assemblierung.	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung alternativer Spleißprozesse.	4
Abbildung 3:	Regulatorische Elemente alternativer Spleißprozesse.	5
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des „polypyrimidine tract-binding protein“ (PTB).	7
Abbildung 5:	Modelle der PTB-Repression.	9
Abbildung 6:	Schematische Darstellung von PTB-vermitteltem Spleißen des α -Tropomyosin-Gens.	10
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Raver1-Proteins.	12
Abbildung 8:	Modellvorstellung eines trimeren Raver1-PTB-RNA Komplexes.	14
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Raver2-Proteins.	16
Abbildung 10:	Raver-Gesamtproteine binden nicht an Ribohomopolymere.	55
Abbildung 11:	Die RRM-Domänen von Raver1 binden an Ribohomopolymere.	56
Abbildung 12:	Die Raver2-RRMs sind in der Lage, mit Guanotin-Ribohomopolymeren zu interagieren.	57
Abbildung 13:	Die RRM der Raver-Proteine binden in vitro an total-RNA.	58
Abbildung 14:	Schematische Darstellung chimärer Raver-RRM-Proteine.	59
Abbildung 15:	Die R1C2-Chimäre bindet an Guanotin-Ribohomopolymere.	60
Abbildung 16:	Die R2C2-Chimäre weist eine den Raver2-RRMs vergleichbare Bindung an Ribohomopolymere auf.	61
Abbildung 17:	Darstellung der chimären Raver-Fusionsproteine C2R1 und C2R2.	62

Abbildung 18:	Die C2R1-Chimäre lässt sich über ein bakterielles System nicht aufreinigen.	62
Abbildung 19:	Die C2R2-Chimäre zeigt eine erhöhte Präferenz für Uridin-Ribohomopolymere im Vergleich zum hnRNP C2.	63
Abbildung 20:	Raver1 kann über die Bindung an PTB in trimeren Komplexen mit Ribohomopolymeren co-präzipitiert werden.	64
Abbildung 21:	Darstellung der generierten PTB-Bindungsmutanten im Raver1-Protein.	65
Abbildung 22:	Die PTB Bindungsmutante M3 des Raver1-Proteins co-lokalisiert nicht mit PTB in den „perinucleolar compartments“ (PNCs).	67
Abbildung 23:	Der EGFP-Fusionsanteil nimmt keinen Einfluss auf die Ausbildung von PNCs in HeLa Zellen.	68
Abbildung 24:	Die reduzierte Lokalisation der Raver1 M3-Mutante in den PNCs ist nicht Konstrukt-abhängig.	69
Abbildung 25:	Darstellung der generierten PTB-Bindungsmutanten im Raver2-Protein.	70
Abbildung 26:	Darstellung der rekombinanten Expression und Aufreinigung von PTB-Fusionsproteinen.	71
Abbildung 27:	Funktionelle GST-PTB-Aufreinigung durch Oligo (dT) Cellulose-beads.	72
Abbildung 28:	Die PTB-Bindungsmotive im Raver2-Protein sind essentiell für die Interaktion mit PTB.	73
Abbildung 29:	Die Raver2-Mutanten zeigen eine stark reduzierte Bindung an PTB.	74
Abbildung 30:	Die Raver2-Doppelmutante zeigt eine stark reduzierte Bindung an den PTB-RNA-Komplex.	75
Abbildung 31:	Exemplarische Analyse der Raver1 Expression in Wildtyp- und Raver1-KO-Mäusen.	77
Abbildung 32:	Darstellung der durch PTB vermittelten Spleißprozesse der in der Arbeit untersuchten Gene.	79
Abbildung 33:	Raver1 defiziente Mäuse zeigen keine veränderten Spleißmuster in Hirn und Darm für die Gene α -Tropomyosin, GABA-Rezeptor $\gamma 2$ und PTB.	82
Abbildung 34:	Der „knock out“ von Raver1 in der Maus führt zu Spleißverschiebungen in Hirn und Darm für die Gene α -actinin, c-src und FGF-Rezeptor2.	84
Abbildung 35:	Raver1-defiziente Mäuse weisen eine signifikante Verschiebung im Spleißverhältnis des α -Tropomyosin-Gens in Herz, Uterus und Lunge auf.	87
Abbildung 36:	Raver1-defiziente Mäuse zeigen in Herz und Lunge eine Reduktion der c-src mRNA.	88
Abbildung 37:	Raver1-KO-Mäuse zeigen in nicht-neuronalen Geweben eine Reduktion der epithelialen Spleißvariante des FGF-Rezeptor2.	90
Abbildung 38:	Reduktion der PTB- und Raver1-Expression nach RNAi-Behandlung.	92
Abbildung 39:	Der siRNA-vermittelte „knock down“ von PTB und Raver1 bewirkt eine Verschiebung im α -Tropomyosin-Gen zu Gunsten der NM-Variante.	94
Abbildung 40:	Der spezifische „knock down“ von PTB führt zu einer verstärkten Inkorporation	96

des neuronalen N1-Exons in die c-src-mRNA.

Abbildung 41:	Der „knock down“ von Raver1 zeigt keinen direkten Einfluss auf das alternative Spleißen des FGF-Rezeptor2 in HeLa- und HEK-Zellen.	98
Abbildung 42:	Mengenverhältnisse der epithelialen und mesenchymalen Isoform des FGF-R2 in HeLa- und HEK-Zellen.	103
Abbildung 43:	In vitro Spleiß-Analysen der Fas-Rezeptor mRNA in HeLa-Zellen.	109
Abbildung 44:	Das alternatives Spleißen des Fas-Rezeptors in MEFR1-KO-Zellen ist gegenüber den Wildtyp-Zellen unverändert.	111
Abbildung 45:	Das „Skipping“ des Fas-Rezeptor Exon6 kann in murinen Geweben nicht nachgewiesen werden.	112
Abbildung 46:	Raver1 zeigt keine co-repressive Funktion auf das alternative Spleißen des Fas-Rezeptor Exon6 in HeLa- und HEK-Zellen.	113
Abbildung 47:	Schematische Darstellung aller verwendeten Proteine.	156

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper	24
Tabelle 2:	Zusammenfassung aller eingesetzten Zweitantikörper und anderer verwendeter Agenzien	24
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Trenngels	37
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Sammelgels	37
Tabelle 5:	Zusammenfassende Darstellung der durch Raver1-vermittelten Spleißverschiebungen in murinen Geweben und humanen Zellen.	101
Tabelle 6:	Aus Amplifikationsplots ermittelte relative Verteilung der Isoformen in Wildtyp-Geweben und Wildtyp-Zelllinien.	107
Tabelle 7:	Liste der in quantitativen qPCRs und konventionellen PCRs verwendeten Oligonukleotide.	152
Tabelle 8:	Auflistung aller verwendeten siRNA-Duplices.	155
Tabelle 9:	Auflistung aller zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide.	155

5.4 Verwendete Oligodesoxynukleotide

Tabelle 7: Liste der in quantitativen qPCRs und konventionellen PCRs verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Spezifität
mTpm1_Kontr_s	AGGCCGAGAAGGCTGCAGATGAGA	Maus α -Tropomyosin Kontrolle (forward)
mTpm1_Kontr_r	ATGACCAGCTTACGGGCCACCTCT	Maus α -Tropomyosin Kontrolle (reverse)
mTpm1_SM_s	GAGCTGAGCAAGCGGAGGCTGATAAGA	Maus α -Tropomyosin Glattmuskel (forward)
mTpm1_SM_r	CTTTTCTCCGCCAGCTCCAGTTTCTCCT	Maus α -Tropomyosin Glattmuskel (reverse)
mTpm1_NM_s	GAGGAGGAGTTGGATCGTGCTCA	Maus α -Tropomyosin Nicht-Muskel (forward)
mTpm1_NM_r	GGATCTCCTGAATCTCCATCTTTTCTTC	Maus α -Tropomyosin Nicht-Muskel (reverse)
hTpm1_Kontr_s	AAGCTGAGAAGGCAGCAGATGAGA	Human α -Tropomyosin Kontrolle (forward)
hTpm1_Kontr_r	ATGACCAGCTTACGGGCCACCTCT	Human α -Tropomyosin Kontrolle (reverse)
hTpm1_NM_s	GAGCAAGCAGCTGGAAGATGAGCTGGTGTC A	Human α -Tropomyosin Glattmuskel (forward)
hTpm1_NM_r	GTCGGCTTCAGCATCGGTGGCCTTTTTC	Human α -Tropomyosin Glattmuskel (reverse)
hTpm1_SM_s	GAGCAAGCAGCTCGAGGAGGACATCG	Human α -Tropomyosin Nicht-Muskel (forward)
hTpm1_SM_r	GCTACGTCGGCTTCAGCCTTGGCGG	Human α -Tropomyosin Nicht-Muskel (reverse)
mSrc_Kontr_s	GCGGCTACCCAGCTGGTGGACAT	qPCR Maus c-src Kontrolle (forward)
mSrc_Kontr_r	GAGCCGGGCCAACCCAAAGTCG	qPCR Maus c-src Kontrolle (reverse)
mSrc_non_neuro_s	AGGCTTCAACTCCTCGGACACCGTCAC	qPCR Maus c-src nicht-neuronal (forward)
mSrc_non_neuro_r	AGCCACCAGTCTCCCTCTGTGTTATTGA	qPCR Maus c-src nicht-neuronal (reverse)
mSrc_neuro_s	CACCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAGT	qPCR Maus c-src neuronal (forward)
mSrc_neuro_r	TCTCTGACATCCACCTTCCTCGTGTTATT	qPCR Maus c-src neuronal (reverse)
hSrc_Kontr_s	GCGGCTGCCTCAGCTGGTGGACAT	qPCR Human c-src Kontrolle (forward)
hSrc_Kontr_r	GAGCCGAGCCAGCCCAAAGTCG	qPCR Human c-src Kontrolle (reverse)
hSrc_non_neuro_s	AGGCTTCAACTCCTCGGACACCGTCAC	qPCR Human c-src nicht-neuronal (forward)
hSrc_non_neuro_r	AGCCACCAGTCTCCCTCTGTGTTGTTGA	qPCR Human c-src nicht-neuronal (reverse)
hSrc_neuro_s	CACCTTTGTGGCCCTCTATGACTATGAGT	qPCR Human c-src neuronal (forward)
h-src_neuro_r	TCTCTGACATCCACCTTCCTCGTGTTGTT	qPCR Human c-src neuronal (reverse)
mFGF_Kontr_s	TTCGGGCAAGTAGTCATGGCTGAA	Maus FGF-R2 Kontrolle (forward)
mFGF_Kontr_r	AGGCCCCCAGGAGGTTGATAATGT	Maus FGF-R2 Kontrolle (reverse)

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Spezifität
mFGF_epi_s	ATGCCCAGCCCCACATCCAGTG	Maus FGF-R2 epithelial (forward)
mFGF_epi_r	GGCAGGACAGTGAGCCAGGCAGAC	Maus FGF-R2 epithelial (reverse)
mFGF_mes_s	TGCCCAGCCCCACATCCAGT	Maus FGF-R2 mesenchymal (forward)
mFGF_mes_r	TATATTCCCCAGCATCCTCAAAAGTTACATT C	Maus FGF-R2 mesenchymal (reverse)
hFGF_Kontr_s	TTTGGGCAAGTGGTCATGGCGGAA	Human FGF-R2 Kontrolle (forward)
hFGF_Kontr_r	AGGCTCCAAGAAGATTTATGATAT	Human FGF-R2 Kontrolle (reverse)
hFGF_epi_s	ATGCCCAGCCCCACATCCAGTG	qPCR Human FGF-R2 epithelial (forward)
hFGF_epi_r	GGCAGGACAGTGAGCCAGGCAGAC	Human FGF-R2 epithelial (reverse)
hFGF_mes_s	TGCCCAGCCCCACATCCAGT	Human FGF-R2 mesenchymal (forward)
hFGF_mes_r	TATATTCCCCAGCGTCCTCAAAAGTTACATT C	Human FGF-R2 mesenchymal (reverse)
mGABA_Kontr_s	TTGCCCAAACCTGGTATGACAGACG	Maus GABA-R γ 2 Kontrolle (forward)
mGABA_Kontr_r	TAGCCTTAAGGTGTAGAGAACTCGACCATC AT	Maus GABA-R γ 2 Kontrolle (reverse)
mGABA_non_neuro_s	AAATCTCTGCCCAAGGTCTCCTATGTCACAG	Maus GABA-R γ 2 nicht-neuronal (forward)
mGABA_non_neuro_r	GAATATCAATGGTAGGGGAGGGTTTTTCT	Maus GABA-R γ 2 nicht-neuronal (reverse)
mGABA_neuro_s	CCCTCTTCTTCGGATGTTTTCTTCA	Maus GABA-R γ 2 neuronal (forward)
mGABA_neuro_r	GCGAATATGTATCCTCCCATGTCTCCA	Maus GABA-R γ 2 neuronal (reverse)
mActn_Kontr_s	GGAAGTGGCCGGCCAGATGAGAAA	Maus α -actinin Kontrolle (forward)
mActn_Kontr_r	GTGCGGCGGATCCACTCCAACAGA	Maus α -actinin Kontrolle (reverse)
mActn_NM_s	GGCAACGACCCCCAGGGAGAGGC	Maus α -actinin Nicht-Muskel (forward)
mActn_NM_r	CTTATCTCCAGCCAGGATCTTGAAGGAAGCC AT	Maus α -actinin Nicht-Muskel (reverse)
mActn_SM_s	CATCCGTGTGGGCTGGGAGCAG	Maus α -actinin Glattmuskel (forward)
mActn_SM_r	TCATGCCCCGTCTTCTCCGGTCAAA	Maus α -actinin Glattmuskel (reverse)
mPTB_Kontr_s	TTCATGCTGAAGGGGAAGAACCAG	Maus PTB Kontrolle (forward)
mPTB_Kontr_r	AGGTTTCCAGACTGGACGGAGTTT	Maus PTB Kontrolle (reverse)
mPTB_s	CCTCTTTATTCTCTTCGGCGTCTACGGTGATG	Maus PTB (forward)
mPTB_r	CTCCCGAGGCAGCTGCACACTCTGA	Maus PTB (reverse)
mPTBtr_s	AATCTGAACCCTGAGGAGCCACCTGAACG	Maus PTB trunkiert (forward)
mPTBtr_r	GCGGGGAGCTGCCATAGTCCTTGGTC	Maus PTB trunkiert (reverse)

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Spezifität
hPTB_Kontr_s	CCTGATGCTGAAGGGGAAAAACCAG	Human PTB Kontrolle (forward)
hPTB_Kontr_r	AGGTTCCCCGACTGGACCGAGTTC	Human PTB Kontrolle (reverse)
mFas_Kontr_s	GCGATTCTCCTGGCTGTGAACACT	Maus Fas-Rezeptor Kontrolle (forward)
mFas_Kontr_r	GATTCAGGGTCATCCTGTCTCCTTTTC	Maus Fas-Rezeptor Kontrolle (reverse)
mFas_membr_s	GTTCGCTGCGCCTCGTGTGAAC	Maus Fas-Rezeptor Membran-gebunden (forward)
mFas_membr_r	TTCCGGTACTTTTCGATATATAAATACAAGTG G	Maus Fas-Rezeptor Membran-gebunden (reverse)
mFas_lösl_s	GTTCGCTGCGCCTCGTGTGAAC	Maus Fas-Rezeptor löslich (forward)
mFas_lösl_r	TCCGGTACTTTTCGATATATAAATATTTGTTTC C	Maus Fas-Rezeptor löslich (reverse)
hFas_Kontr_s	TGTAACCTCTACTGTATGTGAACACTGTGACC CT	Human Fas-Rezeptor Kontrolle (forward)
hFas_Kontr_r	GATTCATGAGAACCTTGGTTTTCTTTCT	Human Fas-Rezeptor Kontrolle (reverse)
hFas_membr_s	GTGACCCTTGACACCAAATGTGAACA	Human Fas-Rezeptor Membran-gebunden (forward)
hFas_membr_r	TCTGTACTTCCTTTCTCTTCACCCAAACA	Human Fas-Rezeptor Membran-gebunden (reverse)
hFas_lösl_s	GTGACCCTTGACACCAAATGTGAACA	Human Fas-Rezeptor löslich (forward)
hFas_lösl_r	TTTTCTGTACTTCCTTTCTCTTCACTTCCTCT	Human Fas-Rezeptor löslich (reverse)
hFAS_PT1	GTCGACGACACTTGCTCAAC	humanes Fas Minigen (Izquierdo et al., 2005)
hFAS_PT2	AAGCTTGCATCGAATCAGTAG	humanes Fas Minigen (Izquierdo et al., 2005)
mR1_RTExon6_s	TCCACTGCACTGCTGCAGCTA	Maus Raver1 Kontrolle (forward)
mR1_RTExon7_r	CTGCAGACAGCTCCCCAAGGA	Maus Raver1 Kontrolle (reverse)
hR1_Exon6_s	TCCACGGCGCTGTTGCAGCTC	Human Raver1 Kontrolle (forward)
hR1_Exon7_r	CTGCAGGCAGCTCCCCGAGGA	Human Raver1 Kontrolle (reverse)
mRaver2_Kontr_s	ACCATCAAGGGGAGCCAAGTTCAA	Maus Raver2 Kontrolle (forward)
mRaver2_Kontr_r	AGTGTAAGATGGCGGAGGGGAGTG	Maus Raver2 Kontrolle (reverse)
hRaver2_Kontr_s	ACCATCAAGGGCAGCAAAGTCCAG	Human Raver2 Kontrolle (forward)
hRaver2_Kontr_r	AATGTAAAAATGCAGGAGAGATGG	Human Raver2 Kontrolle (reverse)
mCyc_s	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	Maus Cyclophilin (forward)
mCyc_r	GTCAACCCCAACCGTGTCTT	Maus Cyclophilin (reverse)
hCyc_s	AGGGTTCTTGCTTTACAGA	Human Cyclophilin (forward)
hCyc_r	TGGCAGTGCAGATGAAAAAC	Human Cyclophilin (reverse)

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Spezifität
mRPLP0_s	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	Maus RPLP0 (forward)
mRPLP0_r	CCATCAGCACACAGCCTTC	Maus RPLP0 (reverse)
hRPLP0_s	ACAACCCAGCTCTGGAGAAA	Human RPLP0 (forward)
hRPLP0_r	TGCCCCTGGAGATTTTAGTG	Human RPLP0 (reverse)
mRPL7_s	GAAGCTCATCTATGAGAAGGC	Maus RPL7 (forward)
mRPL7_r	AAGACGAAGGAGCTGCAGAAC	Maus RPL7 (reverse)
mGAPDH_s	GTGTGAACGGATTTGGCCGT	Maus GAPDH (forward)
mGAPDH_r	GACAAGCTTCCCATTCTCGG	Maus GAPDH (reverse)
hGAPDH_s	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	Human GAPDH (forward)
hGAPDH_r	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	Human GAPDH (reverse)

Tabelle 8: Auflistung aller verwendeten siRNA-Duplices.

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Lokalisierung in der RNA [nt]
„non-silencing“	Allstar Negative Control siRNA	Proprietary (Qiagen)
R1siRNA1	AUCUAGAGGCGGCAGCUCUUCUCC	96-120
R1siRNA2	AAGUGGGCGAGCCUGAAUAGAAGUG	1911-1936
PTBsiRNA	AACUCCAUCAUCCAGAGAAAAGC	+(36 -61) 3' UTR

Tabelle 9: Auflistung aller zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Vektor
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGGCGA	pcDNA3 und pGEM® T-easy
SP6-Promotor	GATTTAGGTGACACTATAG	pcDNA3 und pGEM® T-easy
GFP-5'-Primer	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	pEGFP-C1 und -C2
GFP-3'-Primer	GGTTCAGGGGGAGGTGTGGG	pEGFP-C1 und -C2
pQE30_s	GGAGAAATTAACATATGAGAGG	pQE30
pQE30_r	GTTCTGAGGTCATTACTGG	pQE30

5.5 Verwendete Konstrukte

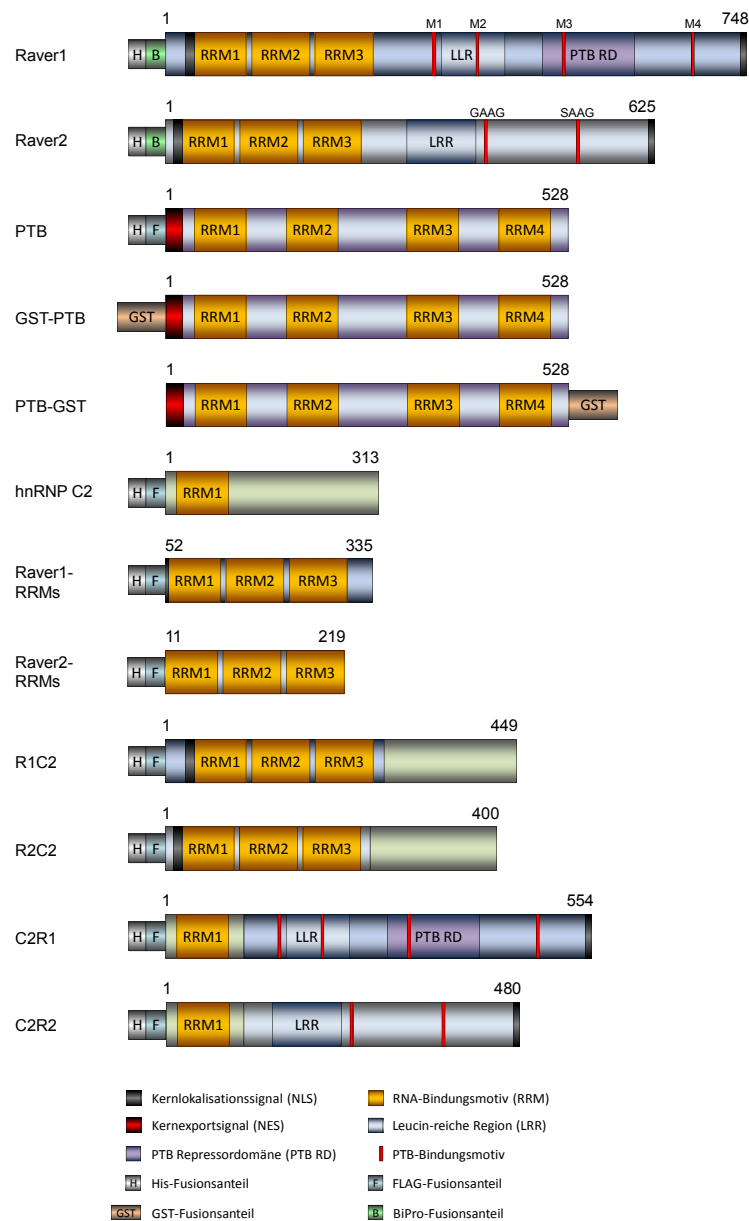


Abbildung 47: Schematische Darstellung aller verwendeten Proteine. Der strukturelle Aufbau der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteine ist durch die farbliche Hervorhebung der charakteristischen Domänen dargestellt. Fusionsanteile (His, BiPro, FLAG, GST) zur Aufreinigung oder Detektion der Proteine sind als kleinere Rechtecke N- und C-Terminal in den jeweiligen Proteinen gekennzeichnet. Die Aminosäuren der einzelnen Proteine ohne zusätzliche Fusionsanteile sind durch Zahlen oberhalb jedes Proteindiagramms dargestellt. Links sind die in der Arbeit verwendeten Bezeichnungen der Proteine aufgelistet. Dabei tragen ausschließlich die GST-Fusionsproteine GST-PTB und PTB-GST den Fusionsanteil im Namen, da es eine Unterscheidung von N- und C-terminalem „tag“ ermöglicht. Alle weiteren Proteine besitzen lediglich N-Terminale Fusionsanteile. Im Raver1- und Raver2-Proteindiagramm sind außerdem die in der Arbeit verwendeten PTB-Bindungsmutanten (Raver1: M1, M2, M3, M4; Raver2: GAAG, SAAG) gekennzeichnet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Mentorin Frau PD Dr. Susanne Illenberger danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit unter Ihrer Leitung anzufertigen. Deine fachliche Kompetenz, Organisationstalent und vor allem Deine Motivationsbereitschaft auch während mancher Durststrecken und trotz „Fernbetreuung“ waren mir von großem Wert. Vielen, vielen Dank!!!

Herrn Professor Dr. Hans-Henning Arnold danke ich für die Übernahme des Co-Referats und die Bereitstellung der Raver1-„knock out“-Mäuse.

Herrn Professor Dr. Norbert F. Käufer danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und sein reges Interesse an meiner Arbeit als Spleiß-Experte des Institutes.

Herrn Professor Dr. Martin Korte danke ich für finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe uneingeschränkt fortführen zu können.

Bei Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch möchte ich mich für Ihr wissenschaftliches Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Bei Dr. Stefan Hüttelmaier möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Einführung in „real-time“-PCR-Analysen bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Dr. Nadine Stöhr, Juliane Braun, Doreen Weidensdorfer und Dr. Marcell Lederer für Ihre Unterstützung.

Dr. Martin Rothkegel möchte ich für seine Hilfsbereitschaft bei allen Belangen des Laboralltags danken.

Ein großes Dankeschön gebührt Sabine Buchmeier für die viele Arbeit und Mühen bei der Herstellung von reichlich PTB und- Raver2-spezifischen Antikörper sowie die Gespräche über die schönsten Ecken von Paris.

Ein großes Dankeschön geht auch an Carmen Wucherpfennig und Tania Messerschmidt (siehste, die Chimären sind drin! ☺) für die großartige Unterstützung bei den Experimenten und die schönen Stunden im Labor.

Ganz Besonderer Dank gilt meiner langjährigen Labormitstreiterin Dr. Berenike Henneberg, die durch ihre immerwährende Unterstützung den Forschergeist in mir ausgeprägt hat sowie unsere unterhaltsamen Gespräche über die alltäglichen Problemchen.

Auch den weiteren Mitgliedern des ehemaligen Labors 156, Manou Fabienke, Sabine Becke und Jasmin Will danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Unterstützung auf dem Raver-Forschungsgebiet und auch allen anderen Angelegenheiten.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen drei Kollegen und Freunden Guido „Mr. Heartmountain“, „Super-Kai“ und unserem „Labor-Devil“ Marén mit denen ich sehr viel Spaß im und auch außerhalb des Labors hatte und es immer wieder gut geklappt hat sich völlig zum „Obst“ zu machen. Ich frage mich bis heute wie das Biozentrum uns überstehen konnte ☺.

Ich danke ebenso meinen Freunden Fabian „Seppel“, Stefan „Onkel Bud“, Nancel, Micha „Bäume“, Gritti, Nicky „Räuber“, Maik „Der Duke“, Daniel, Hilmar, Riechie, Steven, Matze, Christian, Tine und natürlich meinem Bruder Florian für die Wochenenden an denen man die Kuh fliegen lassen konnte, wenn ich mal nicht schreiben musste.

Meiner Familie und vor allem meiner Mutter möchte ich für ihre lebenslange Unterstützung in allen Bereichen ganz herzlich danken ohne die ich nicht da wäre wo ich jetzt bin.

Dir liebe Sandra danke ich für Deinen bedingungslosen Rückhalt, Deine Liebe und Unterstützung und vor allem, dass Du mit dem Geschenk unserer gemeinsamen Tochter Maya mein Leben um so vieles bereichert hast.

Schließlich bedanke ich mich für die finanzielle Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG.